

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO EN  
ISLOTES PANCREÁTICOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Inés Hernández Fisac**

Bajo la dirección del doctor  
Jorge Tamarit Rodríguez

**Madrid, 2008**

- **ISBN: 978-84-692-1015-4**

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



## CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO EN ISLOTES PANCREÁTICOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

Inés Hernández Fisac

Bajo la dirección del doctor

Jorge Tamarit Rodríguez



JORGE TAMARIT RODRÍGUEZ, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: Que Dña. Inés Hernández Fisac, licenciada en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi tutela el trabajo titulado: "CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO EN ISLOTES PANCREÁTICOS", que presenta para la obtención del Título de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular.

Consideramos que el trabajo realizado ha sido satisfactorio y es apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la universidad complutense de Madrid.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Madrid, a 5 de marzo de 2008.

VºBº del Director

Dr. Jorge Tamarit Rodríguez



“La felicidad humana, generalmente, no se logra con  
grandes golpes de suerte que pueden ocurrir pocas  
veces, sino con pequeñas cosas que ocurren todos los  
días”

**Benjamín Franklin**



Por fin ha llegado el momento de los agradecimientos, el punto final de todo el proceso que ha supuesto esta tesis. Espero no olvidar a nadie de todos los que me habéis apoyado y que me habéis ayudado, de distinta forma, para que finalmente escribiese esta tesis. A todos vosotros GRACIAS.

Hoy no estaría aquí sin mis padres. Con ellos descubrí mi primer microscopio y vi mi primera célula. Ellos me mostraron la pasión y la belleza de la ciencia, me orientaron profesionalmente para que finalmente llegase aquí, me apoyaron siempre en mis decisiones y me animaron con su interés y su pasión por la investigación. Gracias.

Tengo que agradecerle mucho también a Jorge, mi director de tesis, por el apoyo que me ha brindado en estos últimos años. Además de mi director, también ha sido un compañero. Sin su orientación, estímulo, inspiración, tesón y constancia, mi tesis no sería hoy lo que es. Por enseñarme algo que espero recordar siempre: “cada día aprendes lo que no debes hacer al día siguiente”.

Durante estos últimos años he estado acompañada también por Javi, al que además de su ayuda en el laboratorio, también tengo que estarle muy agradecida por su amistad, su compañía, los buenos ratos que hemos pasado juntos, por compartir la experiencia de investigar. A Sergio, por enseñarme al principio, lo más difícil.

No me gustaría olvidarme del Dr. Rafael Martín del Río, que a colaborado tanto con nosotros, midiendo nuestras muestras y aportando ideas y ánimos durante todos estos años.

En el departamento me he sentido muy bien, muy arropada y muy querida. Gracias por las palabras de ánimo y por vuestras sonrisas. Tengo que agradecerse en especial a los “chicos de abajo”, a Carmen “G punto”, Carmen “S punto”, Patri, Mar, “Peter”, David, Vane, Pili (...) porque además de vuestro apoyo, también me habéis ofrecido vuestra amistad, vuestra alegría, vuestro cariño y... varias noches de juerga... Especialmente tengo que agradecerle a María, que además de todo eso, ha sido mi paño de lágrimas en muchas ocasiones. A las chicas de arriba, las chicas de los “Ramos”, empezando por Moisés, que ya casi es uno de “ellas”, y al que debo agradecerle el conocer el laboratorio en el que he desarrollado mi tesis, a Eva, por los ratitos de cafetería entre prácticas y por su cariño, a Ana, un ejemplo de fuerza y entereza admirable, a Onintza, por sus saludos... “especiales” por el pasillo, a Ruth, por su simpatía, a Marina, por compartir conmigo las alegrías que nos han dado nuestras becas-contrato en estos años (...). Y muy especialmente a María, tan importante para mí durante estos años, con la que he compartido muy buenos momentos y también alguno malo, por darme tu sincera amistad, por aceptar la mía. Gracias. Has sido un gran apoyo y espero que sigas a mi lado muchos años más.

Además, no puedo olvidarme de Antonio (“Antuan”) y Ángeles (mi Mari-geles particular), por su amistad y su ayuda en el “labo”. Gracias por esos desayunos tan divertidos... y por todo lo demás. Me alegro mucho de haberos encontrado por el camino.

En el terreno personal, fuera de aquí, de la facultad, también he tenido mucha suerte, porque me he rodeado de gente que, además de quererme y aceptarme, me ha comprendido totalmente, que me ha respetado y me ha apoyado siempre en mi trabajo. Tengo que agradecerle a Natalia e Isaac sus ánimos y su apoyo, pero en especial a Natalia por todo lo que hemos compartido, por tu amistad. A María, por ser tú, por quererme, por alegrarte conmigo, por entenderme siempre, por estar siempre que te necesito. A Luis, por ser mi amigo (y casi primo) desde siempre, por tu confianza, por darme siempre ánimos en todo, por ser cómo eres. A Diego y María, por estar siempre, por vuestra amistad y vuestros ánimos. A Rober y Bea, por vuestro interés (el de uno más justificado que el de otros... ejem, ejem. Sin comentarios). Por preocuparos por mis ratitas... y por mí, claro.

Y en general, quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han pasado por mi vida durante estos años y me han ayudado con una palabra amable o de ánimo. A los que quizás no estén aquí reflejados y deberían estarlo, perdonadme el descuido. Muchas gracias a todos.

He dejado para el final las personas más importantes para mí durante estos años y durante... siempre. Esto no resta protagonismo e importancia al resto, pero estoy segura de que lo entenderéis... A mis padres, Jose y Rosa, que además de lo ya dicho anteriormente, tengo que agradecerlos que siempre hayáis estado conmigo, que me hayáis guiado durante toda mi vida tan bien como lo habéis hecho, que hayáis sido un ejemplo tan importante para mí. Gracias por esperar siempre de mí todo lo que puedo dar y por ilusionaros con mis



alegrías y darme ánimos y empujarme a seguir en los momentos no tan buenos. A mi hermano Javi, por tu apoyo, tu cariño, tus intentos por entender mi trabajo, por ser cómo eres.

En la sección de “personas más importantes” ocupa un lugar especial Ricardo, al que tengo que agradecerle los años que hemos estado juntos. Por estar siempre a mi lado, por acompañarme en el camino, por respetarme, por quererme, por entenderme, por hacerme reír, por tu amor incondicional, por compartir tu vida con  
la  
mía.

---

<b>ADP</b>	adenosina difosfato
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>CaMKII</b>	proteína quinasa de calmodulina (II)
<b>CPT1</b>	carnitina-palmitoil transferasa 1
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>FADH</b>	flavín adenín dinucleótido
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA-T</b>	GABA transaminasa
<b>GAD</b>	descarboxilasa del ácido glutámico
<b>GDH</b>	glutamato deshidrogenasa
<b>GHB</b>	$\gamma$ -hidroxibutírico
<b>Gln</b>	glutamina
<b>Glu</b>	ácido glutámico, glutamato
<b>H<sup>+</sup></b>	protón
<b>IDDM</b>	Diabetes Mellitus de tipo I o insulín-dependiente
<b>K<sup>+</sup><sub>ATP</sub></b>	canal de potasio dependiente de ATP
<b>KC</b>	cetocaproico
<b>KIC</b>	$\alpha$ -cetoisocaproico
<b>KIV</b>	$\alpha$ -cetoiisoalérico
<b>KMV</b>	$\alpha$ -cetometilalérico
<b>LDCV</b>	<i>large-dense core vesicle</i> ; vesículas de núcleo denso
<b>Leu</b>	leucina
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenín dinucleótido, oxidado
<b>NADH</b>	nicotinamida adenín dinucleótido, reducido
<b>NADP<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato, oxidado
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato, reducido
<b>NIDDM</b>	Diabetes Mellitus de tipo II o insulín-independiente

<b>PKC</b>	proteína quinase C
<b>RRP</b>	<i>readily releasable pool</i> ; vesículas cebadas listas para liberarse
<b>SLMVs</b>	del inglés <i>synaptic-like microvesicles</i>
<b>SSA</b>	semialdehído succínico
<b>SSA-dh</b>	semialdehído succínico deshidrogenasa
<b>SSA-R</b>	semialdehído succínico reductasa
<b>Succ</b>	ácido succínico
<b>Succ-dh</b>	succínico deshidrogenasa
<b>TCA</b>	ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs)
<b>Val</b>	valina
<b>VDCCs</b>	canales de calcio dependientes de voltaje
<b><math>\alpha</math>-KG</b>	$\alpha$ -cetoglutarato
<b><math>\alpha</math>-KG-dh</b>	$\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa

ÍNDICE

---



<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>1. UNA APROXIMACIÓN HISTOLÓGICA .....</b>	<b>21</b>
<b>2. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA .....</b>	<b>23</b>
<b>3. LA CÉLULA BETA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Mecanismos proximales.....</b>	<b>24</b>
3.1.1. Transporte de glucosa y glicólisis.....	24
3.1.2. El poder reductor y la generación de ATP.....	26
3.1.3. El glutamato como mensajero en la célula $\beta$ .....	27
3.1.4. El malonil-CoA como mediador de la respuesta secretora.....	28
3.1.5. El NADH como mediador de la respuesta.....	29
<b>3.2. Mecanismos distales.....</b>	<b>30</b>
3.2.1. Canales de potasio dependientes de ATP ( $K^+_{ATP}$ ).....	31
3.2.1.1. Un poco de historia.....	31
3.2.1.2. Estructura del canal $K^+_{ATP}$ .....	31
3.2.1.3. Funcionalidad del canal $K^+_{ATP}$ .....	33
3.2.1.4. Regulación metabólica del canal $K^+_{ATP}$ .....	34
3.2.2. Los canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje.....	38
3.2.2.1. Tipos de canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje.....	38
3.2.2.2. Estructura molecular de los canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje .....	40
3.2.2.3. Los canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje y la célula $\beta$ .....	42
3.2.3. Canales de potasio dependientes de voltaje ( $K^+_V$ ).....	43
3.2.3.1. Estructura molecular de los canales $K^+_V$ .....	43
3.2.3.2. Regulación de la actividad de los canales $K^+_V$ en la célula $\beta$ .....	44
3.2.4. Dinámica y exocitosis de los gránulos de insulina .....	45
3.2.4.1. Los gránulos de secreción .....	46
3.2.4.2. Maquinaria exocitótica de la célula $\beta$ .....	47
3.2.4.3. ¿Cómo se reponen los gránulos del grupo RRP?.....	48
3.2.4.4. Cebado de los gránulos de secreción ( <i>priming</i> ).....	50
3.2.4.5. Endocitosis de los gránulos de secreción.....	52

<b>4. DIABETES MELLITUS .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Diabetes Mellitus tipo 1 (IDDM) .....</b>	<b>54</b>
4.1.1. Principales autoantígenos.....	55
4.1.2. Papel del GAD65 en el desarrollo de la IDDM.....	57
<b>4.2. Diabetes Mellitus tipo 2 (NIDDM) .....</b>	<b>58</b>
<b>5. ÁCIDO <math>\gamma</math>-AMINOBUTÍRICO (GABA).....</b>	<b>59</b>
<b>5.1. Un poco de historia .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2. El <i>shunt</i> del GABA .....</b>	<b>61</b>
5.2.1. El <i>shunt</i> del GABA en la célula $\beta$ .....	63
5.2.2. Transportador vesicular de GABA.....	64
<b>5.3. Teoría de la acción paracrina frente a la teoría del catabolismo     del GABA.....</b>	<b>66</b>
<b>6. OTROS SECRETAGOGOS .....</b>	<b>69</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>75</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
<b>1. DISECCIÓN DE TEJIDOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....</b>	<b>81</b>
A.- Islotes .....	81
B.- Cerebelo.....	82
C.- Hígado .....	83
<b>2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS .....</b>	<b>83</b>
<b>2.1. Valoración espectrofotométrica .....</b>	<b>83</b>
A.- Actividad semialdehído succínico deshidrogenasa .....	85
B.- Actividad semialdehído succínico reductasa .....	85
C.- Actividad $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa .....	86
D.- Actividad succínico deshidrogenasa .....	87
<b>2.2. valoración fluorimétrica .....</b>	<b>88</b>
A.- Actividad semialdehído succínico deshidrogenasa .....	88
B.- Actividad semialdehído succínico reductasa .....	88
C.- Actividad $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa .....	89

<b>3. RADIOINMUNOENSAYO (RIA)</b>	<b>90</b>
A.- Marcaje y purificación de la insulina radioyodada	90
B.- Radioinmunoensayo (RIA)	92
C.- Medida de la secreción de insulina	95
D.- Medida del contenido de insulina	96
<b>4. PERIFUSIÓN</b>	<b>96</b>
<b>5. MEDIDA DE AMINOÁCIDOS</b>	<b>98</b>
<b>6. WESTERN BLOTTING: INMUNOTRANSFERENCIA</b>	<b>98</b>
A.- Preparación del tejido	98
B.- Separación e identificación de proteínas	99
<b>7. INMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>102</b>
<b>8. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS</b>	<b>103</b>
A.- Muestras para actividad enzimática o Western Blotting	104
B.- Muestras para medida de aminoácidos	104
<b>9. RT-PCR A TIEMPO REAL</b>	<b>105</b>
A.- Extracción del RNA	105
B.- Retrotranscripción del RNA	106
C.- PCR a tiempo real	109
<b>10. MEDIDA DEL METABOLISMO</b>	<b>112</b>
A.- Oxidación de glucosa	112
B.- Oxidación de glutamina	113
<b>11. VALORACIÓN DE DNA</b>	<b>114</b>
<b>12. ELECTROFISIOLOGÍA</b>	<b>115</b>
<b>13. VALORACIÓN DE GHB (ÁCIDO <math>\gamma</math>-HIDROXIBUTÍRICO)</b>	<b>117</b>



<b>RESULTADOS .....</b>	<b>121</b>
<b>A.- ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LOS ENZIMAS RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL GABA .....</b>	<b>123</b>
<b>A1.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....</b>	<b>123</b>
<b>1.- Estudio de la actividad de dos enzimas del <i>shunt</i> del GABA: semialdehído succínico reductasa y semialdehído succínico deshidrogenasa .....</b>	<b>123</b>
<b>1.1.- Caracterización, en rata, de la actividad enzimática por absorbancia.....</b>	<b>124</b>
<b>1.1.1.- Valoración en cerebelo.....</b>	<b>124</b>
<b>1.1.1.1.- Estudio del efecto del KB 5 mM en el enzima SSA-dh.....</b>	<b>125</b>
<b>1.1.2.- Valoración en islotes pancreáticos.....</b>	<b>127</b>
<b>1.1.3.- Valoración en hígado .....</b>	<b>128</b>
<b>1.2.- Caracterización, en rata, de la actividad enzimática por fluorescencia .....</b>	<b>129</b>
<b>1.2.1.- Valoración en cerebelo .....</b>	<b>130</b>
<b>1.2.2.- Valoración en islotes pancreáticos .....</b>	<b>131</b>
<b>1.2.2.1.- Caracterización de la inhibición de la SSA-R por KIC.....</b>	<b>132</b>
<b>1.2.2.2.- Caracterización de la inhibición de la SSA-dh por KB.....</b>	<b>132</b>
<b>1.2.3.- Valoración en hígado .....</b>	<b>133</b>
<b>2.- Estudio de la actividad enzimática de dos enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos: <math>\alpha</math>-cetoglutarato deshidrogenasa y succínico deshidrogenasa.....</b>	<b>134</b>
<b>2.1.- Caracterización, en rata, de la actividad enzimática por absorbancia.....</b>	<b>134</b>
<b>2.1.1.- Actividad succínico deshidrogenasa .....</b>	<b>135</b>
<b>2.1.2.- Actividad <math>\alpha</math>-cetoglutarato deshidrogenasa .....</b>	<b>135</b>
<b>2.2.- Caracterización, en rata, de la actividad enzimática por fluorescencia .....</b>	<b>137</b>

<b>A2.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....</b>	<b>139</b>
<b>DISCUSIÓN PARCIAL .....</b>	<b>141</b>
<b>B.- ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN RELACIÓN CON EL GABA Y SU METABOLISMO .....</b>	<b>144</b>
<b>B1.- CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL GABA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA .....</b>	<b>145</b>
1.- Contenido de GABA en presencia de eGABA y glutamina 1 mM.....	146
2.- Efecto del GABA sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa .....	147
3.- Efectos electrofisiológicos del ATP sobre la célula $\beta$ .....	152
4.- Efecto del GABA sobre la exocitosis de los gránulos de insulina .....	155
<b>DISCUSION PARCIAL.....</b>	<b>156</b>
<b>B2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE VARIOS ENZIMAS DEL SHUNT DEL GABA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA .....</b>	<b>160</b>
1.- Efecto del KB sobre la secreción de insulina inducida por glucosa .....	160
2.- Efecto de inhibidores de GAD65/67 sobre la secreción de insulina inducida por glucosa .....	162
<b>DISCUSIÓN PARCIAL .....</b>	<b>163</b>
<b>C.- CONTENIDO Y SECRECIÓN DE AMINOÁCIDOS EN PRESENCIA DE GLUCOSA Y GLUTAMINA .....</b>	<b>164</b>
<b>DISCUSIÓN PARCIAL .....</b>	<b>168</b>
<b>D.- LOCALIZACIÓN DEL GABA Y DE LOS ENZIMAS RELACIONADOS CON EL GABA DENTRO DEL ISLOTE .....</b>	<b>169</b>

<b>D1.- LOCALIZACIÓN VESICULAR DEL GABA .....</b>	<b>170</b>
1.- Efectos de la temperatura y la latrotoxina .....	170
2.- Efecto de la eliminación del calcio extracelular .....	172
<b>DISCUSIÓN PARCIAL .....</b>	<b>174</b>
<b>D2.- IDENTIFICACIÓN DE GAD 65/67 Y VIAAT EN EL ISLOTE</b>	
<b>PANCREÁTICO .....</b>	<b>175</b>
1.- Identificación por Western Blotting de ambas proteínas .....	175
2.- Localización de VIAAT en cortes de páncreas .....	176
<b>DISCUSIÓN PARCIAL .....</b>	<b>177</b>
<b>E.- METABOLISMO OXIDATIVO DE GLUCOSA Y GLUTAMINA .....</b>	<b>178</b>
1.- Oxidación de glucosa .....	179
2.- Oxidación de glutamina .....	180
2.1.- Efecto de la glucosa .....	180
2.2.- Efecto de varios inhibidores del <i>shunt</i> del GABA .....	181
2.3.- Efecto del SAD (dimetil ester del ácido succínico) .....	183
<b>DISCUSIÓN PARCIAL .....</b>	<b>183</b>
<b>F.- FORMACIÓN DE ÁCIDO <math>\gamma</math>-HIDROXIBUTÍRICO .....</b>	<b>186</b>
<b>DISCUSIÓN PARCIAL .....</b>	<b>188</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>189</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>203</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>207</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>211</b>

## INTRODUCCIÓN

---



## 1.- UNA APROXIMACIÓN HISTOLÓGICA

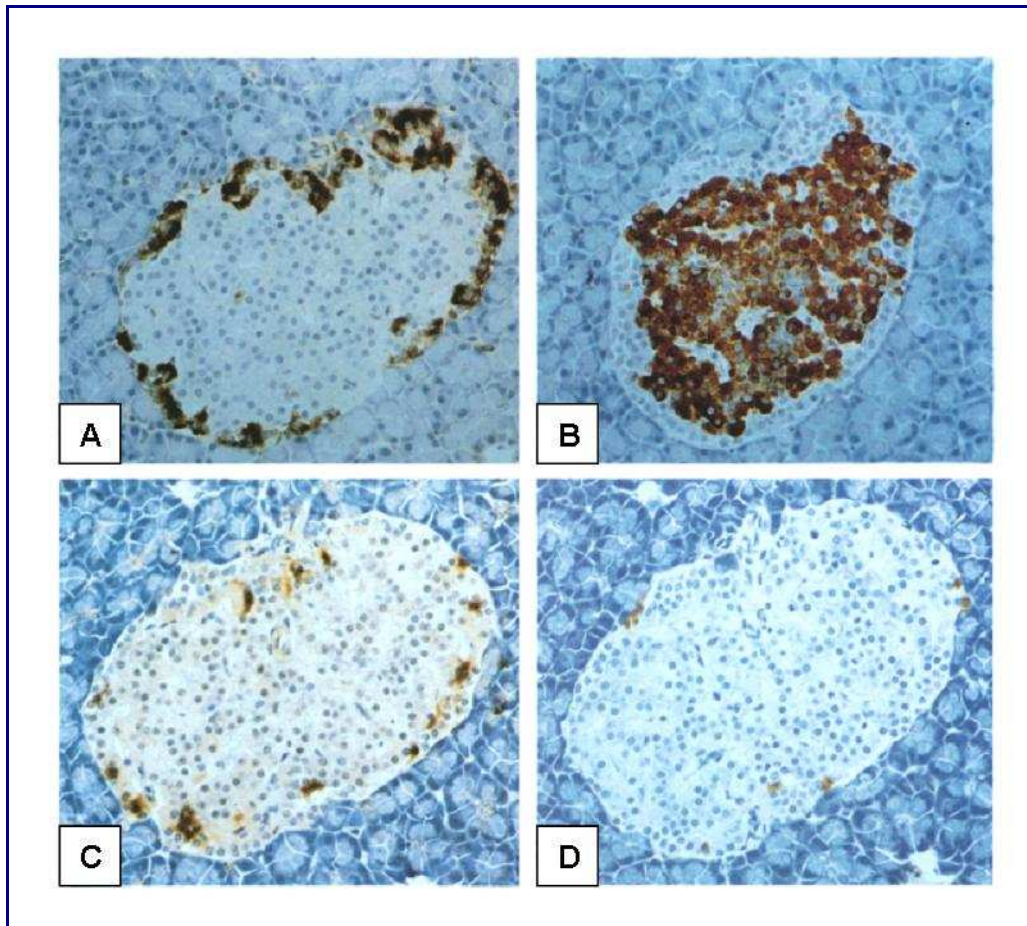
El páncreas es un órgano en el que se desarrollan funciones tanto exocrinas, como endocrinas. El páncreas exocrino se encarga de sintetizar, almacenar y secretar diversas enzimas digestivas. Rodeado por este conjunto de ductos y acinos, que constituyen el páncreas exocrino, se encuentran unas pequeñas asociaciones de células endocrinas especializadas que están organizadas en *islotos pancreáticos* o *islotos de Langerhans*. Cada islote posee una fina red capilar y está encapsulado por colágeno (1).

Estas agrupaciones fueron descubiertas en 1869 por Paul Langerhans, pero no fue hasta 1894 que Laguesse les atribuyó la función endocrina del páncreas, descrita pocos años antes por Mering y Minkowski en 1889.

Un páncreas adulto contiene cerca de un millón de islotes. El tamaño de estos islotes varía enormemente según la región del páncreas en la que se encuentren. Pueden oscilar entre 5000 y 18000 células (2). A pesar de estas variaciones, en el caso de ratas adultas, la arquitectura interna de los islotes es constante y característica. Se han identificado 4 tipos celulares distintos (1) (figura 1):

- *Células  $\beta$* : son las encargadas de sintetizar y secretar insulina. Están dispuestas en el centro de los islotes.
- *Células  $\alpha$* : son las responsables de la secreción de glucagón. Se distribuyen en la periferia del islote.
- *Células  $\delta$* : secretan somatostatina. Se localizan con variabilidad en el islote.
- *Células secretoras del polipéptido pancreático*: normalmente se localizan en la periferia del islote, pero a veces también se encuentran en el parénquima exocrino.

La proporción de estas células en el islote suele ser del 70% en el caso de células  $\beta$ , del 10-20% para las células  $\alpha$ , 5-10% para células  $\delta$  y 1-2% para las células secretoras del polipéptido pancreático. Las hormonas que se producen por estas células son liberadas al torrente sanguíneo y transportadas al hígado y al resto del organismo por la vena porta (3).

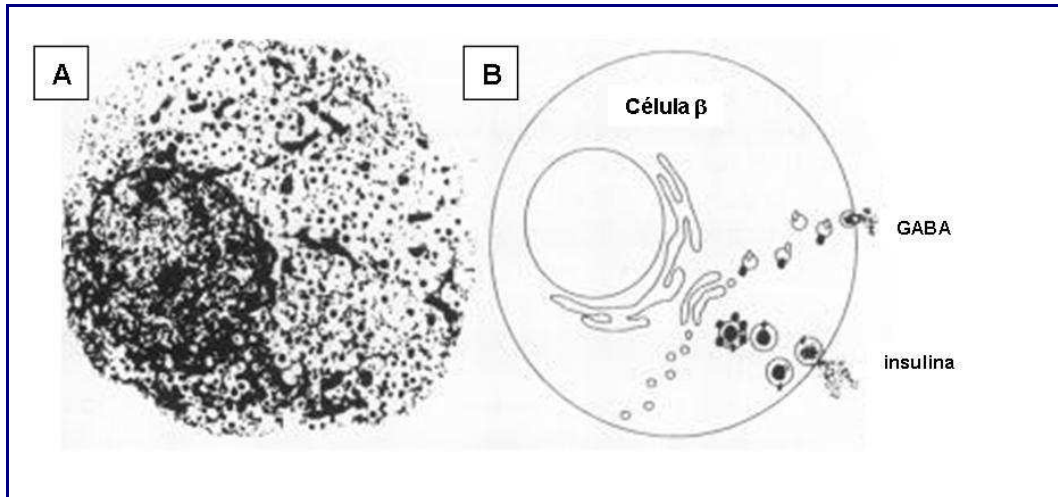


**Figura 1:** Inmunocitoquímica de secciones de islotes de la región esplénica del páncreas de rata Wistar adulta. (Anticuerpos frente a glucagón (A), insulina (B), somatostatina (C) y polipéptido pancreático (D)) (x200) (2).

Las células  $\beta$  poseen ciertas cualidades que recuerdan a otro tipo celular muy alejado de ellas: las neuronas. Ambas poseen escasa capacidad reproductiva y ambas poseen estructuras y mecanismos para la liberación de productos almacenados. En el caso de las células  $\beta$  existen dos tipos de vesículas (figura 2):

- *Vesículas secretoras*, que contienen insulina, carboxipeptidasa H, betagranina, pancreastatina y catepsina B.
- *SLMVs* (microvesículas parecidas a las sinápticas; *synaptic-like microvesicles*), que contienen GABA (ácido gamma-aminobutírico), sinaptofisina y GAD (descarboxilasa del ácido glutámico).

Estos dos tipos de vesículas son análogos a los encontrados en neuronas, siendo las vesículas sinápticas parecidas a las SLMVs y las vesículas LDCV (vesículas de núcleo denso; *large-dense core vesicles*) similares a las vesículas secretoras de insulina. En el caso de las células  $\beta$ , se almacenan miles de gránulos secretores que contienen hexámeros de insulina-zinc, y que son liberados en respuesta a un estímulo secretor, como es la elevación de la glucosa en el torrente sanguíneo (1).



**Figura 2:** Imagen de microscopía electrónica (A) de una célula  $\beta$  en la que se ven gránulos secretores con cristales de insulina en su interior y una representación esquemática de los dos tipos de vesículas (B) (1).

## 2.- HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

De entre las diferentes fuentes de energía que utiliza la célula, la glucosa es la principal. De hecho, el nivel plasmático de glucosa es uno de los parámetros más estrechamente regulados en los mamíferos, debido, principalmente, al equilibrio entre la liberación de insulina, por un lado, y la acción de otras hormonas antagonistas, por otro (4).

La insulina reduce los niveles de glucosa mediante dos procesos simultáneos y coordinados. Por un lado, al inhibir la secreción de glucagón, se suprime la producción hepática de glucosa y la lipólisis. Además, la insulina potencia la captación de glucosa para su utilización como fuente de energía o favorece su almacenamiento en forma de glucógeno o triglicéridos en el hígado, músculo o tejido adiposo (tejidos periféricos).



El principal estímulo fisiológico para la secreción de insulina es el aumento del nivel plasmático de glucosa. También actúan como potenciadores de la secreción los ácidos grasos libres, los cuerpos cetónicos o los aminoácidos. Todos ellos producen un aumento del calcio libre intracelular en la célula  $\beta$ , que conlleva la liberación de insulina.

Durante el ayuno, la captación de glucosa ocurre en tejidos insulino-independientes, principalmente el cerebro. La normoglucemia se consigue gracias a la acción del glucagón y de otros factores hormonales y nerviosos, a través de un incremento de la producción de glucosa en el hígado (aumenta la gluconeogénesis y la glucogenolisis). Alteraciones funcionales a nivel de la célula  $\beta$ , del hígado o del tejido adiposo pueden conducir a trastornos en la homeostasis de la glucosa, al desarrollo de intolerancia a la glucosa, o incluso, a la aparición de una Diabetes Mellitus (5).

### **3.- LA CÉLULA BETA**

Todas aquellas reacciones que se generan en la célula  $\beta$  pancreática y que derivan de su función como “sensor de glucosa” son fundamentales para mantener la homeostasis energética, ya que ajustan la salida de insulina según los niveles reinantes de glucosa en sangre. En ello intervienen multitud de señales mitocondriales que son capaces de regular distintos mediadores de la excitabilidad celular y de la exocitosis. En general los mecanismos implicados en la regulación homeostática de la insulina se pueden dividir en dos amplios grupos (6):

- a) los mecanismos proximales, que engloban todo lo relacionado con la entrada de la glucosa y su metabolismo mitocondrial.
- b) Los mecanismos distales, que abarcan desde la generación de la señal mitocondrial y la iniciación de la actividad eléctrica hasta la exocitosis de los gránulos de insulina.

#### **3.1.- MECANISMOS PROXIMALES**

##### **3.1.1.- Transporte de glucosa y glicólisis.**

La célula  $\beta$ , a grandes rasgos, se caracteriza por tres hechos en relación al metabolismo de la glucosa:

1. La glucosa se puede equilibrar rápidamente a través de la membrana plasmática debido a la expresión del transportador de glucosa de alta capacidad y baja afinidad de tipo 2 (GLUT-2).
2. En el interior celular, la glucosa se fosforila a glucosa-6-fosfato por la acción de la glucoquinasa (Hexoquinasa IV) con una alta  $K_M$ , lo que determina el flujo de paso a la glicólisis (7), por lo que Matchinsky en 1996 la denominó como el auténtico *sensor de glucosa* de la célula  $\beta$  (8).
3. Un vez fosforilada, la glucosa se metaboliza en la glicólisis produciendo piruvato, NADH y ATP.

El piruvato es el precursor de los sustratos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en la mitocondria y se ha postulado como un modulador importante de la secreción de insulina. Paradójicamente, el piruvato es incapaz por sí solo de estimular la secreción de insulina (9). Sin embargo, aunque su derivado permeable (metil-piruvato) es capaz de reproducir el efecto de la glucosa en la primera parte de la secreción, provoca una segunda fase disminuida en un 90% respecto a la secreción producida por el azúcar (10, 11).

De cualquier manera, si el piruvato no es capaz de reproducir el mismo perfil secretor que la glucosa, aun siendo el sustrato encargado de nutrir al TCA para la producción de ATP, quizás no sea el factor que desencadene la secreción de glucosa.

El NADH puede entrar en la mitocondria para producir ATP, a través de las lanzaderas de glicerol fosfato y de malato-aspartato, que exportan  $NAD^+$  otra vez al citosol para que pueda ser reducido otra vez. La inhibición de sólo una de ellas no inhibe la secreción de insulina producida por glucosa, mientras que el bloqueo de ambas a la vez sí elimina totalmente la respuesta a glucosa (12), por lo que se puede afirmar que ambas lanzaderas de NADH son importantes para la respuesta de la célula  $\beta$  a la glucosa.

El único factor mitocodrial conocido que acopla el metabolismo con la exocitosis de insulina es el ATP, a través de su acción directa sobre los canales de potasio dependientes de ATP. Pero existen algunos autores como Henquin y *col* (13) que afirman que determinados secretagogos pueden inducir la secreción de insulina independientemente de los canales de potasio. Autores como MacDonald y *col* (14)

proponen que hay evidencias para afirmar que existen factores mitocondriales adicionales al ATP, que pueden interactuar con él para potenciar o estimular la secreción de insulina. Se basan en la gran capacidad anaplerótica de la célula  $\beta$ . Es decir, en la capacidad que tienen estas células de sintetizar intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos no sólo para ser usados en el mismo TCA. Así, proponen metabolitos como el malato, el citrato o el  $\alpha$ -cetoglutarato.

### 3.1.2.- El poder reductor y la generación de ATP

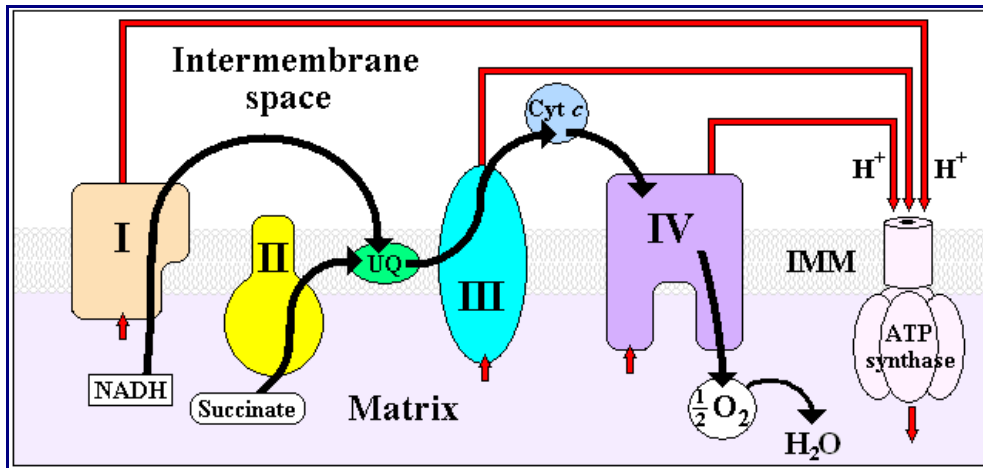
Además del NADH que se produce en el citosol, el NADH también se produce dentro de las mitocondrias a través de la metabolización del piruvato en el ciclo de Krebs. Tanto el NADH generado en la mitocondria, como el transportado al interior mitocondrial desde el citosol son usados como donadores de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Los electrones son transportados hasta reducir una molécula de oxígeno. La energía obtenida con este transporte es usada para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranario, creando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Este gradiente electroquímico de protones es disipado por la ATP sintasa para generar ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico.

La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta por 4 complejos (figura 3). Tres de ellos son transmembrana (membrana interna) y el cuarto está asociado a membrana:

- **Complejo I:** NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona reductasa. Es el encargado de captar dos electrones de NADH y transferirlos al transportador liposoluble ubiquinona, que se reduce a ubiquinol. Durante este proceso, 2 protones se transfieren al espacio intermembrana.
- **Complejo II:** Succínico deshidrogenasa. No es una bomba de protones. Y es el único enzima del ciclo de Krebs asociado a membrana. Es el encargado de transferir los electrones que provienen del FADH (otro donador de electrones) a la ubiquinona.
- **Complejo III:** Complejo citocromo  $bc_1$ . Es el encargado de transportar los electrones desde el ubiquinol al citocromo c, un transportador

hidrosoluble del espacio intermembrana, a la vez que bombea dos protones a través de la membrana.

- **Complejo IV:** Citocromo c oxidasa. Capta los cuatro electrones que le ceden las cuatro moléculas de citocromo c y los trasfiere al oxígeno para producir dos moléculas de agua. A su vez, transloca cuatro protones al espacio intermembrana.



**Figura 3:** Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial. Los electrones se representan como flechas negras y los protones como flechas rojas. (IMM: membrana mitocondrial interna).

La cadena de transporte de electrones, al bombear protones (un total de 4  $H^+$ ) a la matriz mitocondrial produce una hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna. Esto estimula al uniporter de calcio dependiente de potencial que se encuentra en esta misma membrana, favoreciendo así la entrada de calcio a la matriz mitocondrial (15). Este calcio estimula el transporte de ATP hacia el citosol, aumentando así la concentración de ATP y el cociente ATP/ADP (16). De hecho, en la mitocondria se produce el 98% del ATP de la célula  $\beta$  (17).

### 3.1.3.- El glutamato como mensajero en la célula $\beta$

Se ha propuesto que el glutamato que se forma tras la aminación del  $\alpha$ -cetoglutarato gracias a la acción inversa de la glutamato deshidrogenasa puede constituir una señal para la activación de la secreción de insulina (18). Sin embargo, esta

teoría ha sido rebatida por varios investigadores, ya que los niveles basales de glutamato son bastante elevados en el islote y que parece difícil imaginar un incremento sobre esa cantidad (19). Pero la principal evidencia contra esta teoría es que la glutamina, por sí sola, es incapaz de estimular la liberación de insulina, aun aumentando los niveles de glutamato más de 3 veces (20).

#### **3.1.4.- El malonil-CoA como mediador de la respuesta secretora**

Algunos autores como Corkey (21) sugieren que los acil-CoA de cadena larga pueden ser unos potentes moduladores de la secreción de insulina. Sostienen que la glucosa, al ser metabolizada en la mitocondria de la célula  $\beta$ , se convertiría, parcialmente, en citrato. A través de la lanzadera de piruvato-citrato, sería capaz de salir de la mitocondria, llegando así al citosol, donde existen grandes cantidades de acetil-CoA carboxilasa, que es activada por el propio citrato. Posteriormente, la acetil-CoA carboxilasa transformaría el acetil-CoA (proveniente de la propia glucosa) en malonil-CoA.

El malonil-CoA tiene dos propiedades que marcan su papel en esta teoría. Por un lado, es un potente inhibidor de la carnitina-palmitoil transferasa 1 (CPT1), que es la enzima que cataliza el primer paso específico en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. Esto favorecería la acumulación de acil-CoA de cadena larga en el citosol. Y esta es la segunda característica de este modelo. Los acil-CoA intermediarios juegan un papel importante, ya que pueden acilar proteínas o acoplarse con la dihidroxiacetona fosfato o con el glicerolfosfato para formar lípidos como el diacilglicerol (DAG). Este sería el vínculo con la secreción de insulina. El DAG finalmente activaría a la proteína kinasa C (PKC), y participaría así en la potenciación de la segunda fase de la secreción de insulina (la fase *sostenida*).

Los ácidos grasos, por su parte, tienen la capacidad de amplificar, aunque no iniciar, la secreción de insulina en respuesta a glucosa. Como, en presencia de glucosa elevada, la CPT1 está inhibida por el malonil-CoA, los ácidos grasos no se oxidan, así que aumentan los niveles citosólicos de LC-CoA (acil-CoA de cadena larga), que sí pueden activar varios mecanismos que potencian la secreción. Activan directamente la PKC y estimulan el influjo de calcio, bien a través de los canales de calcio, bien a través de la movilización de los depósitos intracelulares. Pueden también activar directamente la exocitosis o interaccionar con los canales de potasio dependientes de ATP (22).

También pueden controlar otros aspectos funcionales de la célula  $\beta$ , como la acilación de proteínas, la apoptosis mediada por ceramidas o por óxido nítrico (NO) o la unión y activación de factores nucleares de transcripción (23).

Esta teoría no deja de ser controvertida. Prueba de ello son los estudios que se llevaron a cabo en 2001 por el grupo de Mulder (24). Este grupo transfecta un tipo modificado de células  $\beta$  provenientes de un insulinoma de rata (INS-1 832/13) (que tienen la característica, que las diferencia de la línea celular INS-1 convencional, de que presentan una potente respuesta secretora de insulina estimulada por glucosa dependiente e independiente de los canales de potasio sensibles a ATP) con el gen de la malonil-CoA descarboxilasa, de manera que se sobreexpresa. Esto anula el aumento de la malonil-CoA que se produce en presencia de glucosa, de manera que se elimina el vínculo con la secreción de insulina. Según la teoría de B. Corkey (21), esto debería reflejarse en una disminución de la secreción de insulina. Sin embargo, no es así (24).

Es posible que la relación entre ácidos grasos y secreción de insulina pueda explicarse a través de recientes descubrimientos de moléculas como la GPR40 (25). Se trata de una molécula ampliamente expresada en células  $\beta$  pancreáticas y en líneas celulares secretoras de insulina. Los ácidos grasos serían los ligandos de estas proteínas asociadas a proteínas G. Y aunque los resultados son muy preliminares, si que se puede hipotetizar sobre la posibilidad de que los ácidos grasos activen la fosfolipasa C (PLC) tras la unión con estos receptores. Esto produciría la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en DAG e inositol trifosfato (IP3), que activarían la PKC – promoviendo la secreción de los gránulos de insulina- o movilizaría los depósitos internos de calcio, respectivamente (22).

### **3.1.5.- El NADPH como mediador de la respuesta**

Al igual que en la teoría del malonil-CoA, se ha propuesto también que el NADPH pueda ser un vínculo que conecte el metabolismo mitocondrial de los secretagogos energéticos (*fuel secretagogues*) con la respuesta secretora de insulina.

Como producto de la glicólisis, la glucosa se metaboliza en ATP, NADH y piruvato. El piruvato, ya dentro de la mitocondria, puede metabolizarse a través de la piruvato deshidrogenasa a acetil-CoA, de manera que es capaz de generar equivalentes

reductores en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Pero las células  $\beta$  también tienen un alto contenido en piruvato carboxilasa, lo que hace que aproximadamente el 40% del piruvato, que se produce durante la estimulación de la célula por glucosa, entre en el metabolismo mitocondrial en forma de oxalacetato producido tras la reacción con esta enzima. El 60% restante, entraría en forma de acetil-CoA. De esta manera, se estaría favoreciendo la entrada de un flujo anaplerótico hacia el TCA, que debe estar unido a un flujo de salida de otros intermediarios como el citrato o el malato. Es decir, que la entrada anaplerótica que desencadena la piruvato carboxilasa se ve compensada por una salida cataplerótica de intermediarios (26):

*Malato.* A través del enzima málico se convertiría en piruvato y NADPH, completando el *ciclo malato-piruvato*.

*Citrato.* Cuando el citrato abandona la mitocondria se disocia en acetil-CoA y en oxalacetato por acción de la citrato liasa. El acetil-CoA se puede metabolizar a malonil-CoA, que es el mediador propuesto por B. Corkey y que se ha discutido anteriormente. El oxalacetato puede, vía la malato deshidrogenasa citosólica, convertirse en malato, que gracias al enzima málico produciría otra vez piruvato y generaría poder reductor en forma de NADPH. De esta manera se completaría el *ciclo citrato-malato*.

Por lo tanto, a través de esta teoría se dota al ciclado del piruvato de un papel clave en la regulación de la secreción de insulina. Se demuestra también que esta actividad cíclica esta estrechamente relacionada con el grado de respuesta a glucosa de las células  $\beta$ , por lo que se busca el elemento que conecte estos ciclos son la secreción de insulina. El ATP quedaría descartado, ya que no participa en ninguno de los dos ciclos del piruvato. Pero sí existe un intermediario común, el NADPH producido por el enzima málico. Sin embargo, es un campo de trabajo todavía por explorar, ya que aún no se ha demostrado la existencia de una molécula que relacione directamente el NADPH con la secreción de insulina, como podría ser el ATP con los canales de potasio dependientes de ATP (26).

### 3.2.- MECANISMOS DISTALES

La entrada de glucosa en la célula  $\beta$  provoca una depolarización en la membrana celular, que desencadena una serie de acontecimientos que finalizan con la exocitosis de los gránulos de insulina. En ausencia de un estímulo metabólico, las células  $\beta$

permanecen eléctricamente silentes, con un potencial de reposo de -70mV (27), debido a que, en reposo, la conductancia para el ion potasio es bastante elevada.

Cuando la glucosa estimula la célula  $\beta$  se reduce la conductancia para el potasio, que viene regulada por los canales de potasio dependientes de ATP. La membrana se depolariza, esto provoca la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs), favoreciendo una entrada masiva de calcio, que desencadenará la exocitosis de insulina. Finalmente, los canales de potasio dependientes de voltaje se abren, recuperando así el potencial de membrana a su estado basal y cerrando, por lo tanto, los canales de calcio, con el consiguiente cese de la liberación de insulina.

### **3.2.1.- Canales de potasio dependientes de ATP ( $K^+_{ATP}$ )**

#### **3.2.1.1.- Un poco de historia**

A principios de los 70, Dean y Mathews (28) determinaron que el ATP tenía un papel importante en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ , ya que al desacoplar la fosforilación oxidativa desaparecía la respuesta eléctrica generada por glucosa. Posteriormente, en 1984, Cook y Hales (29) y Ashcroft y col (30) demostraron la existencia de canales de potasio que se cerraban por ATP y por glucosa respectivamente. Más tarde, en 1987, Arkhammar y col (31) asociaron el efecto del cierre de estos canales con la entrada de calcio debida a la depolarización de la membrana.

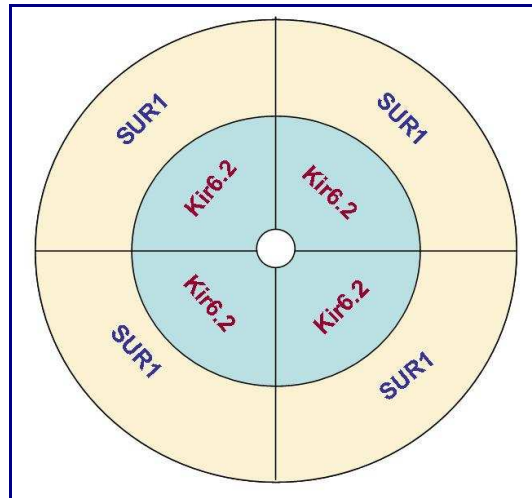
La primera vez que fue descrito, fue en 1983 por Noma en células cardíacas de cobaya, aunque posteriormente se ha localizado su expresión en numerosos tejidos como músculo liso y esquelético, neuronas, axones, células epiteliales y por supuesto, célula  $\beta$ , donde fue clonado por primera vez en 1995 (6).

#### **3.2.1.2.- Estructura del canal $K^+_{ATP}$**

El canal de potasio dependiente de ATP está formado por dos tipos de subunidades: las que forman el poro ( $Kir6.x$ ) y las unidades reguladoras, los receptores



de sulfonilureas (*SUR*). Estas dos subunidades se ensamblan con una estequiometría 4:4 (figura 4).

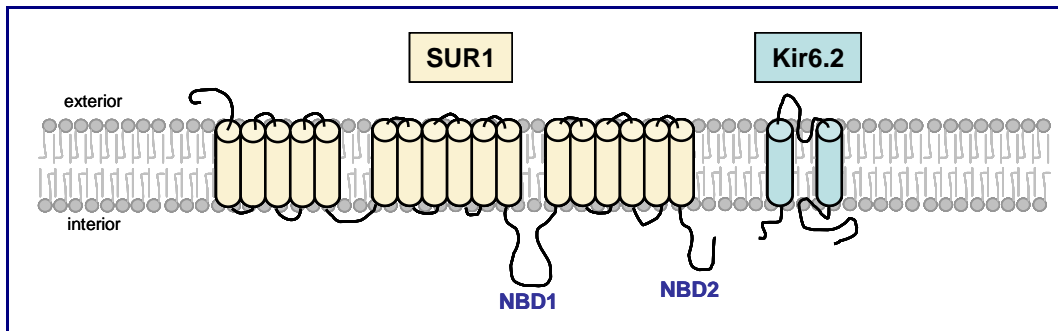


**Figura 4:** El canal de potasio dependiente de ATP es un octámero compuesto por 4 proteínas formadoras del poro (*Kir6.2*) (cada una de 43 KDa) y 4 proteínas reguladoras: los receptores de sulfonilureas (*SUR1*) (cada una de 177 KDa) (32).

Se han descrito dos genes diferentes para *Kir6.x*: *Kir6.1* y *Kir6.2*. De la misma manera también existen dos genes para las subunidades *SUR*: *SUR1* y *SUR2*. Además, se puede incrementar la diversidad por splicing alternativo del gen *SUR2* (32).

La co-expresión de los genes *Kir6.2* y *SUR1* en células de mamíferos resulta en un canal de potasio dependiente de ATP que tienen unas características idénticas a los canales  $K^+_{ATP}$  de las células  $\beta$  nativas (33).

*Kir6.2* pertenece a la familia de canales de potasio que poseen 2 dominios transmembrana (TM) unidos por un *loop* y cuyos extremo amino- y carboxi- terminal se encuentran en el citosol. La subunidad *SUR* pertenece a la superfamilia de transportadores ABC. Estas proteínas se caracterizan por poseer múltiples dominios transmembrana. *SUR1* posee 17 dominios transmembrana en tres grupos de 5+6+6. Además posee dos dominios intracelulares de unión a nucleótidos (NBD) que contienen secuencias consenso para unir e hidrolizar nucleótidos (figura 5). Cada uno de los NBD contienen las secuencias Walter A y Walter B, que están implicadas en la activación de los canales  $K^+_{ATP}$  por Mg-ADP (32).



**Figura 5:** Estructura del canal de potasio dependiente de ATP de la célula  $\beta$ . Está formado por las subunidades formadoras del poro *Kir6.2* y por subunidades reguladoras *SUR1*, que poseen dos dominios citoplásmicos de unión a nucleótidos (NBD) (32).

*Kir6.2* está altamente expresado en célula  $\beta$ , corazón y músculo esquelético y es el encargado de formar el poro del canal de potasio en todos estos tejidos. *Kir6.1* también es capaz de formar los poros de los canales de potasio sensibles a ATP en músculo liso, pero probablemente posea propiedades diferentes a las que manifiestan los canales de potasio formados por *Kir6.2*.

*SUR1* funciona como subunidad reguladora de los canales de potasio en la célula  $\beta$  y en algunos tipos neuronales. *SUR2A* regula canales de potasio en músculo cardíaco y esquelético, y *SUR2B*, en músculo liso.

*Kir6.2* es incapaz de formar canales de potasio sin la presencia de las subunidades reguladoras *SUR*. En su extremo C-terminal, existe una región reguladora que evita que *Kir6.2* sea transportada a la membrana plasmática en la ausencia de *SUR*.

### 3.2.1.3.- Funcionalidad del canal $K^+_{ATP}$

Los secretagogos de insulina pueden dividirse en dos grupos:

- Los “*iniciadores*”. Son aquellos que inician la secreción de insulina por sí solos. En este grupo se incluyen nutrientes como la glucosa, o drogas como las sulfonilureas. Todas estas sustancias inhiben la actividad del canal  $K^+_{ATP}$ . Pero mientras que los nutrientes deben metabolizarse para actuar sobre los canales, las drogas se unen directamente al canal y bloquean su actividad.

- Los “potenciadores”. Son aquellas hormonas (como el glucagón), transmisores (como la acetilcolina) o aminoácidos (como la arginina) que son capaces de amplificar la secreción de insulina inducida previamente por un *iniciador*, pero que no pueden desencadenar la secreción por sí solos.

Hay ciertos compuestos que son capaces de inhibir la secreción de insulina abriendo los canales de potasio, como es el caso del *diazóxido*.

El hecho de que existan sustancias que pueden regular positiva o negativamente la secreción de insulina mediante una acción directa sobre el canal de  $K^+_{ATP}$ , permite afirmar que este canal tiene un papel importante en la regulación de la secreción de insulina por las células  $\beta$ .

Cuando la célula  $\beta$  está en reposo, los canales  $K^+_{ATP}$  están abiertos y se mantiene un movimiento constante de iones  $K^+$  hacia el exterior a través de estos canales. Esto hace que el potencial de membrana en reposo sea de -70mV. En estas condiciones, los canales de calcio están cerrados y no hay exocitosis de insulina. Sin embargo, cuando los niveles plasmáticos de glucosa aumentan, se incrementa tanto la captación, como el metabolismo del azúcar en las células  $\beta$ . De hecho, el efecto de la glucosa sobre estos canales es dependiente de su concentración, y se ha establecido un valor EC50, en islotes intactos, de aproximadamente 5 mM (34). Algunos productos metabólicos son capaces de cerrar los canales de potasio y disminuir así la permeabilidad de la membrana para el potasio, causando la depolarización de la célula. Es decir, que el interior celular se vuelve menos negativo. Esto provoca la apertura de los canales de calcio y el posterior influjo de calcio termina estimulando la secreción de insulina.

La discusión sobre cuál es el producto metabólico de la glucosa que media la respuesta del canal de potasio ha sido bastante controvertida, pero parece que las variaciones intracelulares de los nucleótidos de adenina pueden estar involucradas (32).

#### 3.2.1.4.- Regulación metabólica del canal $K^+_{ATP}$

Los estudios llevados a cabo para determinar cómo se regulan los canales de potasio, se basan en técnicas de *patch-clamp*. Se suele seleccionar una porción de la membrana plasmática que contenga un solo canal de potasio y se registra así la variación de corriente. En este diseño experimental, las concentraciones de nutrientes o de metabolitos se regulan externamente y los canales que se quieren estudiar no se ven sometidos a las concentraciones a las que se ven sometidos en el entorno de la célula completa.

La característica que define a los canales  $K_{ATP}^+$  es que su actividad se ve inhibida por un aumento de la concentración intracelular de ATP. Cuando se mide en porciones aisladas de membrana (*patches*) con una disposición *inside-out* (al seccionar la porción de membrana, la parte interior queda hacia el exterior y el exterior hacia el interior de la pipeta con la que se ha diseccionado la membrana y mediante la que se pueden registrar los cambios en la conductancia iónica), el canal es altamente sensible al ATP (con una  $K_i$  de 10  $\mu$ M de ATP). Sin embargo, se ha estimado que la  $K_i$  para el canal de potasio en las células intactas es de 1-2 mM (35). Por lo tanto, aparentemente, la sensibilidad de los canales  $K_{ATP}^+$  al ATP es mayor en las membranas aisladas que en la célula intacta. Esta paradoja se explica por la presencia de agentes intracelulares que son capaces de reducir la sensibilidad al ATP de los canales en la célula intacta, pero que son eliminados por los lavados que sufren los segmentos aislados de membrana.

Existen varios agentes citosólicos que pueden modular la sensibilidad de los canales frente al ATP, como el oleil CoA, el fosfolípido de membrana  $PIP_2$  (fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato) y los nucleótidos en presencia del ión magnesio (32):

**Oleil CoA:** Es capaz de activar los canales  $K_{ATP}^+$  y de reducir su sensibilidad a ATP. Tan solo 1  $\mu$ M de oleil CoA puede reducir tres veces la sensibilidad a ATP.

La exposición prolongada a ácidos grasos no esterificados, lo que ocurre en las personas obesas, aumenta la concentración intracelular de acil CoA de cadena larga en la célula  $\beta$ , activando los canales de potasio, hiperpolarizando la célula e inhibiendo la secreción de insulina.

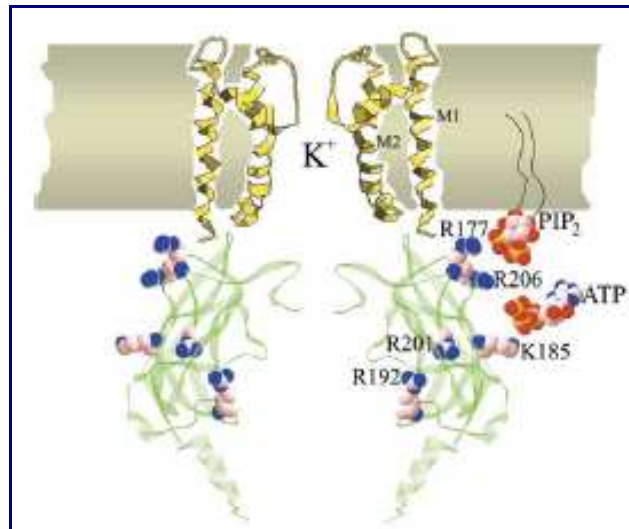
**PIP<sub>2</sub>:** La aplicación de 5  $\mu$ M de  $PIP_2$  es capaz de reducir la  $K_i$  para el ATP de 10  $\mu$ M a 3 mM.

**Mg-nucleótidos:** El Mg-ADP también tiene la capacidad de aumentar la actividad del canal de potasio y de disminuir su sensibilidad a ATP.

Aunque no hay duda de que estos agentes pueden disminuir la sensibilidad de los canales, sus contribuciones bajo condiciones fisiológicas todavía no se conocen exactamente. De hecho, existe cierta controversia acerca de la interacción del  $\text{PIP}_2$ , el ATP y las dos subunidades del canal de potasio (Kir6.2 y SUR1).

Autores como Tarasov y *col* (36) aseguran que el ATP actúa cerrando los canales mediante su unión con la subunidad Kir6.2 y que el Mg-ADP estimula la actividad del canal por su interacción con la subunidad SUR1, a través del dominio NBD. Es decir, postulan que los principales moduladores de los canales  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  serían el Mg-ATP y el Mg-ADP. Su hipótesis se basa en que el Mg-ADP generado por la hidrólisis del ATP en el dominio intracelular NBD de la subunidad SUR1 (o en alguna proteína íntimamente asociada a SUR1), podría ser el responsable de la baja sensibilidad del canal frente a ATP en la célula intacta. Por otro lado, descartan la implicación del  $\text{PIP}_2$  en esta modulación ya que, aunque sí se ha demostrado su efecto negativo sobre la sensibilidad del canal de potasio, no se ha podido comprobar este efecto en condiciones fisiológicas.

Otros autores como Ribalet y *col* (37) proponen que los canales de potasio son bloqueados por ATP y activados por  $\text{PIP}_2$ , mediante su unión a diferentes residuos del extremo C-terminal de la subunidad Kir6.2 del canal. Proponen que cuando el canal se encuentra abierto, existen determinados residuos, localizados en el extremo citoplasmático, en la parte más próxima a la membrana citoplasmática, que son capaces de interaccionar con  $\text{PIP}_2$  y estabilizar el poro en el *status* abierto. Pese al estudio realizado, están de acuerdo con el grupo de Ashcroft en el dudoso papel fisiológico que puede tener la modulación por  $\text{PIP}_2$  (figura 6).



**Figura 6:** Estructura del poro del canal K<sup>+</sup>ATP, que muestra dos subunidades *Kir6.2*. M1 y M2 representan los dos dominios transmembrana. Se muestra la interacción tanto con el PIP<sub>2</sub>, como con el ATP (37).

El grupo de Ribalet aporta también importante información acerca de los residuos implicados en la unión de los tres posibles grupos fosfato que poseen los tres nucleótidos de adenina- AMP (grupo  $\alpha$ -fosfato), ADP (grupos  $\alpha$  y  $\beta$ -fosfato) y ATP (grupos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -fosfato)- así como sobre la secuencia de unión del ATP al canal. El sitio de unión para el ATP estaría localizado en el dominio citoplásmico de la subunidad *Kir6.2*, en la parte más alejada del poro. Cuando el canal está abierto, el fosfato  $\beta$  del ATP se une a determinados residuos de esta región (R50 y K185), desestabilizando la estructura del canal. Esto favorecería el posicionamiento de otro residuo (R201) en la posición óptima para interaccionar con el fosfato  $\alpha$  del ATP, de manera que se estabilizaría el canal de potasio en el *status* cerrado (figura 6).

Realmente ambas teorías serían compatibles, ya que se centran en la modulación de la actividad del canal por el ATP, pero en las dos subunidades diferentes del canal. Es decir, Ashcroft propone que el Mg-ADP disminuye la sensibilidad del canal frente al ATP, a través de la hidrólisis de este último por la subunidad SUR y la posterior unión del producto hidrolizado (el Mg-ADP) a la región NBD. Pero cuando el ATP supera un determinado umbral, sería capaz de interaccionar con los residuos del extremo C-terminal del dominio citoplásmico de la subunidad *Kir6.2*, de manera que cerraría el canal y provocaría la consiguiente depolarización celular, como propone el grupo de Ribalet.

### 3.2.2.- Los canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje

Los canales de calcio dependientes de voltaje son poros conductores del ión  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentran localizados en la membrana plasmática. Cuando la membrana se depolariza, la configuración de estos canales cambia y se abren, permitiendo así el flujo de calcio al interior celular. El  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero que acopla un estímulo eléctrico a una señal química, que en el caso de la célula  $\beta$  se basa en favorecer la liberación de insulina. Pero el calcio también puede controlar otros fenómenos celulares como la proliferación, la diferenciación, la fosforilación proteica, la expresión génica o incluso la muerte celular a través de la iniciación de los mecanismos de apoptosis y necrosis (38).

Por lo tanto, cuando los niveles plasmáticos de glucosa aumentan, se incrementa la entrada de glucosa en las células  $\beta$  y también su metabolismo. Esto genera un aumento del cociente ATP/ADP que inhibe los canales de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ . La célula se depolariza y finalmente, se activan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Se genera un flujo de iones calcio hacia el interior celular que termina desencadenando la secreción de insulina.

La actividad y/o densidad de los canales de calcio está regulada por varios mecanismos, como la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, la fosforilación, translocación o interacción proteica y otros. Por lo tanto, la regulación, tanto positiva como negativa, de la actividad y/o densidad de los canales puede resultar en una mayor o menor exocitosis de insulina, respectivamente (38).

#### 3.2.2.1.- Tipos de canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje

En 1975, Hagiwara elaboró una primera clasificación de las canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , según sus propiedades biofísicas, en canales I (activados por bajo voltaje, LVA) y canales II (activados por alto voltaje, HLA).

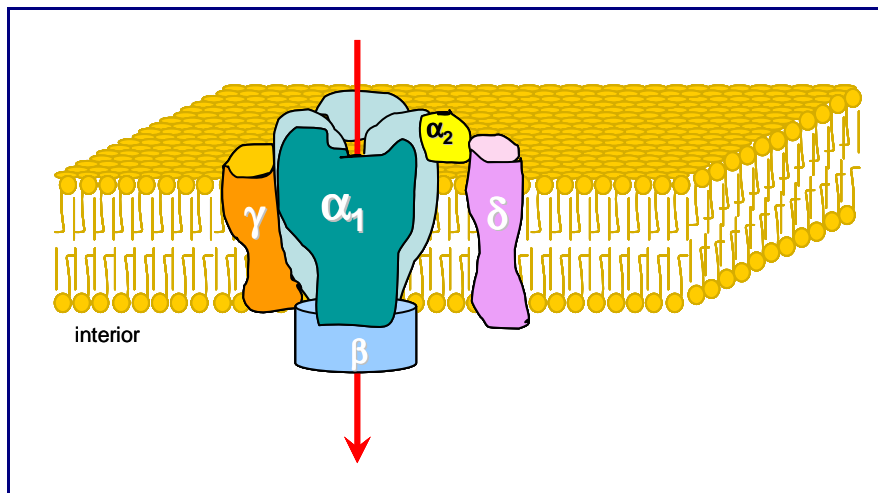
Posteriormente, en 1995, el grupo de Tsien (39) identificó, usando técnicas de *patch clamp* y manipulación farmacológica, varios canales de calcio que clasificó según la nomenclatura usada en la actualidad:

- ▶ **Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo T.** Este tipo de canales necesita una pequeña depolarización para activarse. Se caracterizan por una minúscula (*Tiny*, en ingles) conductancia y por una cinética Transitoria de inactivación. Se han identificado en neuronas, músculos, células endocrinas e, incluso, en células no excitables. Son el único tipo de canales que pertenecen a los anteriormente llamados LVA. El resto de los canales pertenecen al grupo de los HVA.
- ▶ **Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L.** Se caracterizan por su gran conductancia, que además es de larga duración (de ahí su nombre). Están ampliamente distribuidos en todas las células excitables y en alguna no excitable. Son importantes ya que son los encargados de asociar las respuestas de excitación con la contracción, en mantener la homeostasis del calcio, en regulación génica y en secreción de hormonas como la insulina, en el caso de las células  $\beta$ .
- ▶ **Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N.** Fueron encontrados por primera vez en neuronas, razón por la que se les denominó de tipo N. Poseen una conductancia y una tasa de inactivación intermedia entre los tipo L y los tipos T.
- ▶ **Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q.** Los P fueron descubiertos en células de Purkinje (cerebelo), y los Q en los gránulos de células cerebelosas. En un primer lugar se consideraron dos canales distintos, pero hoy se consideran el mismo ya que ambos poseen la misma subunidad conductora de corriente.
- ▶ **Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo R.** Se clasificó como un grupo diferente a los otros debido a su especificidad por determinadas toxinas. Este tipo de canales son claves para generar los potenciales de acción dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y para la liberación de neurotransmisores.

### 3.2.2.2.- Estructura molecular de los canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje.



El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  está compuesto por 5 subunidades: la principal subunidad transmembrana formadora del poro es la subunidad  $\alpha_1$ , que se asocia a una serie de subunidades que ya no son formadoras de poro, y que se conocen como *subunidades auxiliares*: el dímero  $\alpha_2\delta$  (unido por un puente bisulfito), la subunidad intracelular  $\beta$  y la subunidad transmembrana  $\gamma$  (figura 7). Estas subunidades juegan un papel importante en la regulación de la expresión en superficie, en las propiedades de apertura/cierre del canal o en la dependencia del voltaje del mismo (38).

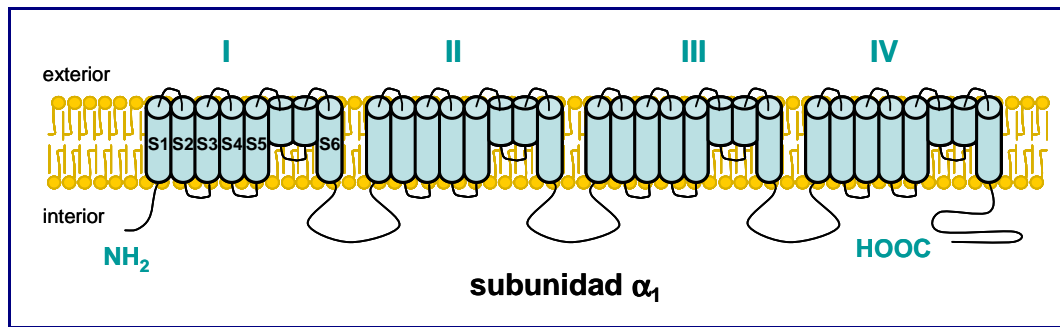


**Figura 7:** Organización molecular del canal de calcio dependiente de voltaje. Alrededor de la subunidad principal  $\alpha_1$  se distribuyen el resto de subunidades, tanto transmembrana ( $\gamma$  y  $\delta$ ), como extra- ( $\alpha_2$ ) e intra-celulares ( $\beta$ ) (38).

### ■ Subunidad $\alpha_1$

Es la principal subunidad transmembrana del canal y está formada por 4 repeticiones homólogas de 6 segmentos transmembranarios (S1-S6), con un *loop* asociado, cada una (figura 8). El fragmento S4 es el sensor de voltaje del que depende la activación del canal. Y el S5, el S6 y el *loop* entre ambos, forman el poro, propiamente dicho. Existen varias subunidades distintas que determinan el tipo de canal (L, P/Q, R...) y que son específicas de tejido.

En la célula  $\beta$ , las dos subunidades expresadas son la  $\alpha_{1C}$  y la  $\alpha_{1D}$ , que se corresponden con los canales de tipo L.



**Figura 8:** Estructura topológica de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio. Está formada por cuatro fragmentos idénticos unidos por un *loop* intracelular. Cada segmento consta de 6 segmentos transmembrana idénticos (S1-S6). Entre los segmentos S5 y S6 existe un *loop* transmembrana. Estos tres segmentos de cada uno de los 4 fragmentos, forman el poro para el ión calcio (39).

### ► Subunidad $\beta$

Es una subunidad enteramente citosólica asociada a la subunidad  $\alpha_1$ . Es sustrato de la proteína quinasa A (PKA), que regula la actividad del canal a través de la fosforilación de esta subunidad. Ejerce dos funciones primordiales: regula el tráfico por la membrana plasmática de la subunidad  $\alpha_1$  y regula las propiedades biofísicas del canal.

Existen 4 tipos distintos de subunidad  $\beta$ , que pueden tener efectos opuestos en cuanto a las cinéticas de activación del canal. Por ejemplo, la subunidad  $\beta_2$  retarda la inactivación, mientras que la  $\beta_3$  acelera el proceso.

En islotes pancreáticos de rata se han identificado las subunidades  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , siendo la primera la más expresada.

### ► Subunidad $\alpha_2\delta$

Ambas subunidades provienen del mismo gen y se unen por puentes bisulfito. Mientras que  $\delta$  posee un único dominio transmembrana,  $\alpha_2$  es totalmente extracelular y es la que interacciona con la subunidad  $\alpha_1$ .

La misión del dímero  $\alpha_2\delta$  es promover el transporte de  $\alpha_1$  a la membrana plasmática y, además, incrementar la amplitud de corriente. Existen 4 tipos distintos de subunidad  $\delta$ , lo que confiere al dímero de diferentes propiedades a la hora de regular la activación o la inactivación del canal.

En páncreas humanos se ha podido identificar la isoforma  $\alpha_2\delta_2$ .

### ► Subunidad $\gamma$

No tiene efecto en el transporte a través del canal, pero sí afecta a las cinéticas de activación/desactivación y es capaz de inhibir la actividad del canal. Se han identificado hasta 8 subunidades distintas.

No se sabe realmente si se expresa en células  $\beta$ .

### 3.2.2.3.- Los canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje y la célula $\beta$

Ya desde 1968 se han asociado las variaciones del calcio extracelular con la capacidad que tienen las células  $\beta$  de responder a glucosa (40). Desde entonces, sucesivos estudios en distintas especies han podido localizar varios de los diferentes tipos de canales de calcio existentes.

Los canales de tipo L son expresados en las células  $\beta$  de todas las especies probadas y en todas las líneas celulares secretoras de insulina estudiadas. Aún así, según la especie, se ha podido también comprobar la expresión de otros canales como los P/Q, los N o, incluso, los R y probablemente los T. Aunque los tipo L están, indiscutiblemente, asociados a la secreción de insulina (son responsables del 60-80% de la respuesta secretora), también los tipo N se han podido asociar a la segunda fase de la respuesta secretora. De los de tipo R se sabe que están relacionados con la exocitosis de insulina, aunque aún se desconoce el mecanismo exacto.

En cuanto a la regulación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , no se puede hablar de activadores/inhibidores endógenos, ya que fisiológicamente, tan sólo el grado de depolarización de la membrana determina la apertura de los canales. Pero se ha propuesto que existe un ajuste más fino de las funciones de cada canal individual. Así, se ha postulado que el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L puede ser modulado por procesos de fosforilación. Se han propuesto, como posibles moduladores, a la proteína quinasa A (PKA), a la proteína quinasa C (PKC) o a la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaM *kinase* II). Aún así, es difícil explicar cómo pueden los procesos de fosforilación regular, *in vivo*, la actividad del canal si el estado basal de fosforilación de estos canales, en la célula  $\beta$ , es ya de por sí bastante elevado.

También se ha propuesto que ese ajuste fino puede ser llevado a cabo por proteínas exocitóticas, que han sido halladas asociadas físicamente a los canales de calcio tipo L. Así, por ejemplo, las syntaxinas 1A y 3 inhiben la actividad de los canales y

la secreción de insulina asociada a calcio. Sin embargo, esta íntima asociación con la maquinaria exocitótica (proteínas SNARE, incluyendo las syntaxinas 1A y 3), puede tener la función de asegurar la co-localización de los canales de calcio con los puntos de la membrana en los que se producirá la exocitosis de insulina (38).

### 3.2.3.- Canales de potasio dependientes de voltaje ( $K^+_v$ )

Tras la depolarización de la célula  $\beta$  provocada por el cierre de los canales de potasio, se produce la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L. Esto genera un aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , que provoca la exocitosis de los gránulos de insulina. Pero debe haber un mecanismo que haga que la membrana celular se repolarice, para que la señal secretora desaparezca y se detenga la exocitosis de los gránulos de insulina.

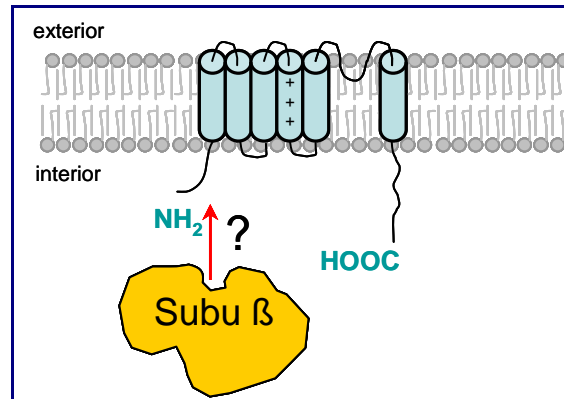
Recientemente, se ha propuesto la existencia de unos canales de potasio dependientes de voltaje y de calcio, que serían los encargados de generar la salida de iones  $K^+$  y, por lo tanto, de repolarizar la célula.

#### 3.2.3.1.- Estructura molecular de los canales $K^+_v$

Los canales de este tipo están formados por un tetrámero constituido por 4 subunidades  $\alpha$  ( $Kv\alpha$ ). Estas subunidades (figura 9) compuestas por 6 dominios transmembrana, pertenecen a una familia formada por 11 miembros. Y aunque los canales están formados de forma heterogénea, y los miembros de las familias Kv5-11 no han sido estudiados aún en profundidad, sí se sabe que estos últimos son incapaces de formar canales funcionales por sí solos, necesitan asociarse con miembros de las familias Kv1-4 para formar poros activos.

La repolarización específica que llevarían a cabo este tipo de canales en la célula  $\beta$  y su papel en la secreción de insulina está sólo empezando a estudiarse. De hecho, un estudio reciente de MacDonald y col (41) ha identificado a la subunidad KV2.1 como la mayor contribuyente a la repolarización a través de la salida de  $K^+$  en células de insulinoma y células  $\beta$  pancreáticas de roedores. Uno de los principales problemas que surgen en el estudio de estos canales es la gran heterogeneidad en su composición, ya que no sólo depende de las 11 diferentes familias de subunidades  $\alpha$ , que se combinan

aleatoriamente, sino que también depende de la asociación con otras subunidades reguladoras, tanto citosólicas como transmembrana. Por ejemplo, existe una expresión diferencial de la subunidad reguladora Kv $\beta$  dependiente de tejido (figura 9). Esta subunidad interaccionaría con el extremo N-terminal y modularía tanto la expresión, como la función del canal. La subunidad  $\beta$  está implicada en otorgar cierta sensibilidad a la subunidad  $\alpha$  respecto a los estados *redox* intracelulares.



**Figura 9:** Estructura de la subunidad transmembrana Kv $\alpha$ , formadora del poro de los canales de K $^{+}$  dependientes de voltaje. Se refleja en el esquema la posible interacción con la subunidad reguladora citosólica Kv $\beta$ .

La subunidad Kv2.1 está sometida también a un alto grado de fosforilación post-translacional, sobre todo en el extremo C-terminal, que puede alterar su activación dependiente de voltaje. Se ha especulado con que los diferentes grados de fosforilación, puedan otorgar a estos canales una cierta especificidad de tejido, pudiendo resultar en canales distintos tanto biofísicamente, como en su interacción con otras subunidades (42).

### 3.2.3.2.- Regulación de la actividad de los canales K $^{+}$ <sub>v</sub> en la célula $\beta$

Las proteínas SNARE han sido propuestas como posibles reguladores de los canales, tanto a través de su actuación aumentando la eficiencia de la subunidad Kv $\beta$  en inactivar las subunidades Kv $\alpha$  (a las que está asociada), como a través de su acción inhibitoria directa sobre el extremo N-terminal de la subunidad Kv $\alpha$ . Las proteínas SNARE, además, aportan un factor importante en cuanto a la localización de los canales

Kv. A través de su interacción, co-localizan a estos canales en los sitios de exocitosis, con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.

También se ha propuesto una regulación hormonal de los canales Kv a través de la activación de la vía de la PKA y la posterior fosforilación de la subunidad  $\text{Kv}\alpha$ , que supondría una activación del canal. De hecho, se ha propuesto que GLP-1 podría aumentar la secreción de insulina estimulada por glucosa, inhibiendo las corrientes de  $\text{K}^+$  a través del canal, de una manera dependiente de la vía  $\text{AMPc}/\text{PKA}$ .

Y como se ha comentado anteriormente, la subunidad  $\text{Kv}\beta$  asociada a las subunidades  $\text{Kv}\alpha$ , tiene la capacidad de actuar de sensor *redox* y de regular los canales en función de la actividad oxidorreductasa dependiente de NADPH que lleva asociada. De hecho existe un estudio publicado en 2003 (43) en el que se ha podido comprobar que un aumento en el potencial *redox* intracelular generado por una elevación del cociente  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  en la célula  $\beta$ , genera una inactivación rápida de la corriente de  $\text{K}^+$  a través de  $\text{Kv}2.1$ , lo que provoca un cambio en la dependencia del voltaje del estado inactivo basal del canal. Significaría que la generación metabólica de NADPH podría reducir la eficacia que tiene los canales Kv para repolarizar las células, es decir, que contribuiría a la excitabilidad de la célula  $\beta$ .

### 3.2.4.- Dinámica y exocitosis de los gránulos de insulina

Una vez analizados todos los elementos que se ven involucrados en la excitabilidad celular, me gustaría analizar el efecto directo que esta excitación tiene sobre la célula  $\beta$  pancreática: la secreción de insulina. La insulina está contenida en gránulos de secreción (LDCV) y es liberada tras la fusión de la membrana de estos con la membrana plasmática. Este proceso es desencadenado por el aumento de la concentración de calcio intracelular (mecanismo descrito con anterioridad) en los sitios de exocitosis.

Los gránulos de insulina son similares a las vesículas secretoras de otros tipos celulares, y existen dentro de las células en diferentes grupos que podríamos clasificar en (44):

- ▶ Reserva intracelular: 90% de los gránulos
- ▶ Grupo anclado a la membrana (*docked*): casi un 10%

- ▶ Grupo listo para liberarse (RRP, *readily releasable pool*): está químicamente cebado a la membrana (*primed*). Este grupo varía entre un 0.3 y un 2.2%. De hecho, el tamaño de este grupo es lo que determina la magnitud de la respuesta secretora inicial.

La primera fase de la exocitosis puede ser provocada por cualquier estímulo que genere un aumento del calcio intracelular, lo que provocaría la liberación de los gránulos ya cebados y de los anclados a membrana (que son los que reponen el grupo RRP). Sin embargo, la segunda fase de la liberación, la fase sostenida, que depende de la movilización de las vesículas desde el interior celular y de su anclaje a la membrana, tan sólo puede ser desencadenada por secretagogos metabolizables. Es decir, que las señales derivadas de la glucosa son necesarias para amplificar y mantener la secreción de insulina, ya que promueven la movilización y el cebado de los gránulos desde el grupo de reserva (6).

#### 3.2.4.1.- Los gránulos de secreción

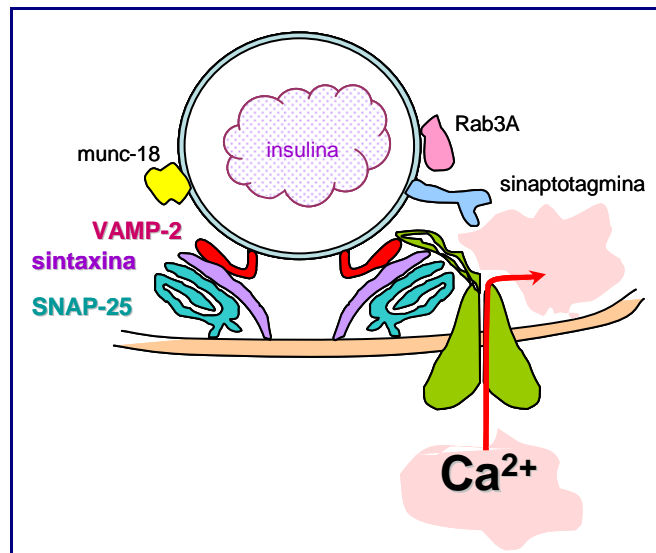
Tras su síntesis en el retículo endoplásmico, la insulina es procesada hasta alcanzar su forma biológicamente activa y es almacenada en los gránulos de secreción hasta el momento de ser liberada. Una célula  $\beta$  contiene cerca de 10000 gránulos de secreción, que son liberados al exterior celular de una manera dependiente de los niveles intracelulares de calcio y con una tasa de liberación que varía según la fase de la secreción en la que se encuentre la célula  $\beta$ . Utilizando técnicas de amperimetría con fibra de carbono se ha podido determinar que un único gránulo de secreción, de una célula  $\beta$  de rata, contiene 1.6 amoles de insulina, alcanzando una concentración dentro del gránulo de 74 mM (44). Durante la primera fase de la secreción se ha determinado que son exocitados entre 40 y 100 gránulos de los que se encuentran en el grupo RRP. En el pico máximo de esta primera fase la tasa de liberación es de un gránulo cada tres segundos. Sin embargo, durante la segunda fase, la fase sostenida, la tasa de liberación es de uno cada 10 segundos (45). Los gránulos que pertenecen al grupo de los RRP pueden ser liberados sin ningún tipo de modificación tras la estimulación y son los que formarían el componente rápido de liberación. Pero la mayoría de los gránulos (95-99%) pertenecen al grupo de los gránulos no liberables, que necesitan una serie de reacciones dependientes de ATP, de  $\text{Ca}^{2+}$ , del tiempo y de la temperatura para ser aptos para su

liberación. Estos procesos necesitan de la formación de complejos SNARE, de los que hablaré posteriormente (44).

### 3.2.4.2.- Maquinaria exocitótica de la célula $\beta$

Tras varios años acumulando datos sobre la secreción de insulina, se ha llegado a un acuerdo acerca del modelo de exocitosis de los gránulos en las células  $\beta$ . El grupo de moléculas que pertenecen a las proteínas SNARE son importantes en la fusión de la membrana. Estas proteínas se asocian para formar complejos que unen las vesículas secretoras a la membrana plasmática, de manera que pueden fusionarse eventualmente e incluirse en la propia membrana (44). Existen proteínas SNARE tanto en las vesículas (v-SNARE), como en la membrana plasmática (t-SNARE; *target*, blanco). El complejo lo forman, por tanto, la syntaxina y SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein-25*, proteína asociada al sinaptosoma-25) de la membrana plasmática (proteínas t-SNARE) y la proteína VAMP-2 (*vesicle-associated membrane protein-2*, proteína asociada a la membrana vesicular-2) (también conocida como sinaptobrevina) de las vesículas de secreción (proteína v-SNARE) (figura 10). Las proteínas SNARE facilitan la exocitosis atrayendo la membrana vesicular hacia la membrana plasmática de manera parecida a una cremallera. Las tres proteínas se asocian mediante interacciones *coiled-coil*, formando un complejo extraordinariamente estable (45). Las proteínas SNARE, además, también se encargan de que la entrada de calcio esté restringida a las zonas de la membrana plasmática que estén en contacto con los gránulos secretores. El *loop* que se encuentra entre los fragmentos II y III de los canales de calcio de tipo L se une a la syntaxina, a SNAP-25 y a la sinaptotagmina, de manera que ancla el canal de calcio al gránulo secretor (figura 10). Gracias a esta unión, el grupo RRP está expuesto a los altos niveles de calcio que existen justo en la entrada del canal de calcio, de manera que la exocitosis de insulina se convierte en un “todo o nada”, en función de si los canales están, o no, abiertos (44).





**Figura 10:** Esquema de la unión entre los gránulos de secreción y la membrana plasmática (cebado, *docking*). Representación de la moléculas v-SNARE (VAMP-2 ó sinaptobrevina) y de la t-SNARE (syntaxina y SNAP-25). También están representadas las moléculas reguladores Rab3A y munc-18, así como el sensor de calcio: sinaptotagmina. El canal de calcio se asocia a través del *loop* entre los fragmentos II y III a las proteínas SNARE, de manera que asocia estrechamente los sitios de entrada de calcio con las vesículas secretoras.

Aun así, las proteínas SNARE no son suficientes para justificar la rápida exocitosis dependiente de la concentración intracelular de calcio. La sinaptotagmina se ha propuesto como el sensor de calcio en la fusión vesicular (44, 6, 45). Los 13 miembros de la familia de las sinaptotagminas poseen dos sitios de unión de calcio: C2A y C2B. En la célula  $\beta$ , se ha propuesto que están implicadas en la exocitosis de las LDCV las sinaptotagminas V y VII, que poseen una gran afinidad por el calcio, de manera que pequeños aumentos en la concentración de este son capaces de desencadenar la exocitosis. También existen otras moléculas como Rab3A (proteínas de unión a GTP), que ejercen una acción negativa sobre la exocitosis de las vesículas en respuesta a un aumento de la concentración de calcio, es decir, que limitan la liberación de insulina (44). De igual manera, proteínas como munc-18 también intervienen en el proceso exocitótico impidiendo la unión entre la syntaxina y SNAP-25, contribuyendo así al control de la liberación de insulina (45) (figura 10).

### 3.2.4.3.- ¿Cómo se reponen los gránulos del grupo RRP?

La mayor parte de los gránulos que se sitúan en la membrana plasmática (85-97%) no están inmediatamente disponibles para su liberación, pero pueden estarlo en poco tiempo sin someterse a grandes desplazamientos. En aproximadamente 1.5 minutos, el grupo RRP puede renovarse completamente, para lo cual es necesario un cierto gasto de energía. Por lo tanto, el grupo RRP es realmente un subgrupo de los gránulos anclados a la membrana (*docked*), que tiene la característica distintiva de estar compuesto por gránulos ya cebados (*primed*). El resto de los gránulos anclados a la membrana, constituye un grupo de reserva que debe ser “activado” antes de poder ser liberado. Por lo tanto, se podría hablar de que la liberación rápida de los gránulos (que podría asociarse con la primera fase de la secreción) puede ser debida a la exocitosis de los gránulos anclados y cebados, y de que la liberación lenta (que se asociaría a la segunda fase de la secreción de insulina) podría deberse, al menos a corto plazo, a la liberación de los gránulos que se encuentran cerca de la membrana, pero que deben de ser cebados antes de su exocitosis (44).

La liberación sostenida a lo largo del tiempo, requiere, en último término, la translocación física de los gránulos a las zonas de liberación. Los gránulos que se encuentran en el interior celular están sometidos a amplios movimientos, que se pueden clasificar en dos clases:

- **Movimientos lentos.** Son movimientos de difusión, aparentemente sin dirección establecida.
- **Salto rápidos y directos.** Ocurren con mucha más frecuencia durante la estimulación con glucosa. Estos movimientos estarían mediados por la proteína *quinesina*, que es un tipo de proteína motora que usa la hidrólisis del ATP (en último término, sintetizado a partir de glucosa) para mover determinadas cargas (en este caso los gránulos de secreción) a lo largo de los microtúbulos que forman el citoesqueleto. De esta manera, se repondría el grupo RRP para mantener la secreción de insulina en el tiempo (44).

Por lo tanto, el grupo RRP sería el responsable de la primera fase de la secreción de insulina estimulada por glucosa. Pero tras la descarga de los gránulos, es necesaria una translocación desde el pool de reserva. Esto ocurre a una velocidad mayor que la velocidad de exocitosis en la segunda fase de la secreción, por lo que se puede afirmar que la tasa de liberación de insulina durante la segunda fase no viene

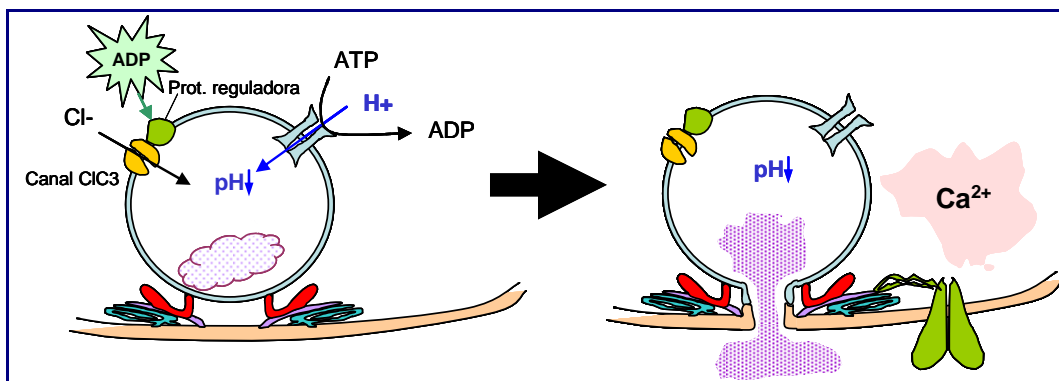
determinada por la velocidad de translocación de los gránulos, sino por la tasa de cebado de los mismos, que es lo que realmente limita la exocitosis (45).

#### 3.2.4.4.- Cebado de los gránulos de secreción (*priming*)

Se puede decir, que en la célula  $\beta$ , la glucosa posee la doble capacidad de desencadenar y amplificar la secreción de insulina. Cuando la glucosa se metaboliza y aumentan los niveles de ATP intracelulares, se cierran los canales  $K_{ATP}^+$  y se abren los canales de  $Ca^{2+}$  tras la depolarización celular. Esto desencadena la secreción de insulina, la exocitosis de los gránulos. Adicionalmente, la glucosa también tiene un papel amplificador de la secreción, que no es dependiente de los canales de  $K_{ATP}^+$ , aunque sí de un aumento de la concentración de calcio intracelular. La señal intracelular que participa en esta función no está claramente determinada, aunque se barajan varias posibilidades (activación de PKA o PKC, producción de ácido araquidónico, óxido nítrico, glutamato, etc.).

Sin embargo, sí que se sabe que variaciones de las concentraciones de ATP y ADP son significativas tras la entrada de glucosa en la célula  $\beta$ . Y aunque la variación de la concentración de ATP en el rango fisiológico no tiene ningún efecto sobre la exocitosis, la variación de la concentración de ADP modula la exocitosis de un modo parecido al producido por la glucosa. Por lo tanto, esto indicaría que el ATP representa el factor permisivo y que la amplificación de la secreción de insulina inducida por glucosa es mediada por cambios en la concentración de ADP, que regularían la exocitosis en este paso de cebado de los gránulos (44). El papel último que el ADP pueda tener no está del todo claro, pero puede que esté relacionado con la activación de la PI4 quinasa y los posteriores efectos en activación de proteínas de manera dependiente del  $Ca^{2+}$  (6). Adicionalmente, hay evidencias (46) que implican la acidificación de los gránulos en el proceso de cebado de las vesículas de secreción. La capacidad de los gránulos de ser cebados dependería de la acción simultánea de la ATPasa de protones de tipo V (V-ATPasa  $H^+$ ) y de los canales vesiculares de cloruro CIC3. El bombeo de protones, a costa de un gasto de ATP, al interior granular acidifica el medio interno, pero es neutralizado parcialmente por la entrada de iones  $Cl^-$ . Se ha propuesto que el ADP, a través de la regulación negativa del canal CIC3 podría actuar como el “interruptor” metabólico que determinase la capacidad de los gránulos para ser liberados (44) (figura 11). El ambiente acidificado del interior granular, además de permitir el cebado de los

gránulos, regula los procesos proteolíticos de las cadena B y C de la proinsulina, ya que permiten la actuación de las endopeptidasas específicas y también favorece el almacenaje de la insulina en forma de hexámeros de insulina- $\text{Zn}^{2+}$  insolubles (47). Pero también se ha propuesto que es necesaria una alcalinización del lumen de las vesículas secretoras que permita la solubilización de la insulina condensada y almacenada, tras la fusión del gránulo con la membrana (48). Mientras que la acidificación se atribuye a la acción del ATP (V-ATPasa  $\text{H}^+$ ) producido por la glucosa, la alcalinización puntual de las vesículas puede deberse a la inhibición de la bomba de protones o a la inhibición del canal de  $\text{ClC3}$  (función atribuida al ADP (44)). Sin embargo, se ha propuesto que la PKA, por mecanismos aún no aclarados completamente, también puede producir una alcalinización vesicular (48) y contribuir así a potenciar la acción secretora de la glucosa, ya que contribuiría a la descondensación de la insulina justo en el momento de ser liberada. Por otro lado, el glutamato también se ha propuesto como elemento potenciador derivado de la glucosa que puede actuar a través de la alcalinización del interior vesicular (49).

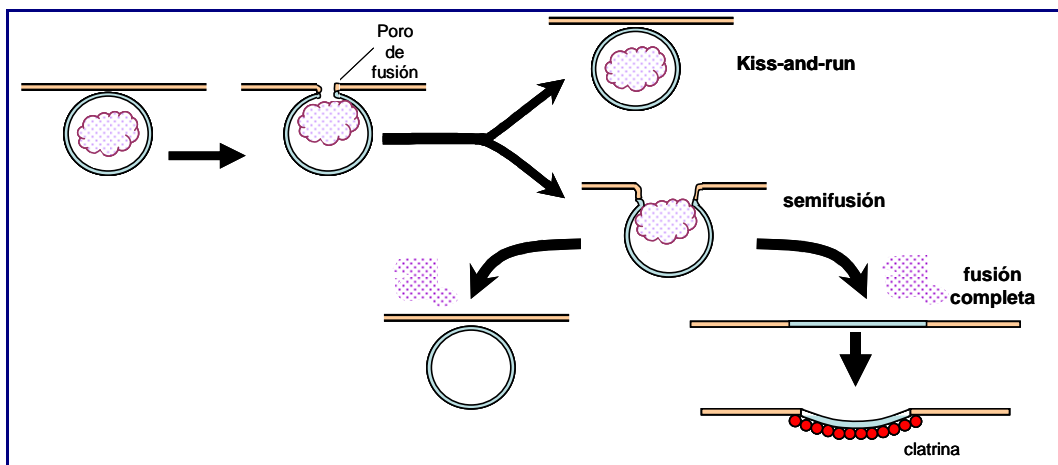


**Figura 11:** Esquema de la regulación metabólica que media el cebado de los gránulos para su posterior exocitosis. El ATP es usado por la V-ATPasa- $\text{H}^+$  para acidificar el medio. El canal de  $\text{Cl}^-$  ( $\text{ClC3}$ ) se necesita paralelamente a la bomba de  $\text{H}^+$ , para mantener la electroneutralidad y permitir que los  $\text{H}^+$  se acumulen en el lumen vesicular (48). Cuando el ADP activa la proteína reguladora, es capaz de inhibir la acción de este canal, de manera que la acidificación intragranular es bloqueada, aunque el gránulo ya está disponible (*primed*) para, ante un estímulo que aumente la concentración de calcio intracelular, ser capaz de liberar su contenido al exterior celular (44).

### 3.2.4.5.- Endocitosis de los gránulos de secreción

Una vez que la exocitosis se ha llevado a cabo, la membrana del gránulo secretado debe ser reabsorbida mediante la endocitosis. Existe una endocitosis rápida (cada 10 segundos) y una endocitosis lenta (cada 100 segundos), siendo la primera importante tras los estímulos débiles, y la segunda para los grandes aumentos de superficie en la membrana celular, tras una estimulación intensa. Existen tres tipos de endocitosis (46) (figura 12):

1. **“Kiss-and-run”**. El contenido del gránulo se libera a través de un poro de fusión que se abre transitoria y reversiblemente durante la exocitosis. El poro puede cerrarse incluso antes de que el interior granular se haya vaciado completamente. Ocurre con poca frecuencia. Recientemente, se ha propuesto que durante este proceso, el tamaño de poro que se genera es insuficiente para liberar la insulina contenida en los gránulos, pero no para liberar el ATP u otros pequeños transmisores que también existen en el interior de los LDCV (50).
2. **Fusión completa**. La membrana granular se integra por completo en la membrana plasmática, y la membrana extra es posteriormente recapturada por la convencional endocitosis mediada por clatrina. Tan sólo ocurre en el 10% de los casos
3. **Semi-fusión**. Es el proceso intermedio entre las dos anteriores. Supone el establecimiento de una gran apertura entre el lumen del gránulo y el espacio extracelular, pero la estructura del gránulo permanece intacta. Este suele ser el proceso que ocurre en el 90% de los casos de liberación y el gránulo suele ser recuperado en menos de 10 segundos.



**Figura 12:** Representación de los tres tipos de endocitosis. Tras la formación del poro de fusión, las vesículas pueden separarse inmediatamente, sin llegar a liberar totalmente su contenido (*Kiss-and-run*). Se puede llegar a formar una gran apertura, por la que se libera todo el contenido intra-granular, pero sin llegar a perder el gránulo su estructura (semi-fusión). Si el gránulo pierde su estructura y se fusiona totalmente con la membrana plasmática, tendrá que ser endocitado en un proceso mediado por clatrina (fusión completa).

#### 4.- DIABETES MELLITUS

Bajo condiciones fisiológicas normales, la entrada de glucosa en la célula  $\beta$  desencadena la liberación de insulina al torrente sanguíneo. La insulina es transportada por la sangre hasta los tejidos periféricos, donde se une a los receptores de insulina para llevar a cabo su acción. Esto inicia una cascada de procesos que culminan en la captación de glucosa por las células y en su metabolización para producir energía o para almacenarse como depósitos de glucógeno (51).

La Diabetes Mellitus es una alteración en el conjunto de procesos relacionados con la utilización de carbohidratos, que se traduce en una elevación de los niveles de azúcares en sangre, lo que generalmente se conoce como una hiperglicemia.

Ya en el siglo I d.C. el filósofo griego Arateus el Capadocio se refirió a esta enfermedad, aludiendo a la poliuria característica de la diabetes. No es hasta el siglo XI que se vuelve a tener registro escrito de los síntomas de esta enfermedad. El médico y filósofo uzbeko Avicena, lo menciona en su famoso *Canon de la Medicina*. Posteriormente, se han ido publicando datos y experimentos que han ido arrojando luz sobre las causas y los procesos involucrados en la diabetes. Aún así las causas últimas que provocan los diferentes tipos de diabetes están aún por descubrir, por lo que también se abre un amplio campo de investigación en terapias que puedan subsanar o paliar parte de los daños y alteraciones que puede terminar provocando esta enfermedad.

Existen 4 tipos diferentes de Diabetes Mellitus:

- Diabetes Mellitus de tipo I o insulino-dependiente (IDDM, *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*). También se conoce como diabetes juvenil. Se destruyen las células  $\beta$  y esto provoca una ausencia total de insulina.

- Diabetes Mellitus de tipo II o no insulino-dependiente (NIDDM, *Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus*). Generalmente se desarrolla en el periodo adulto. Es la más común y se caracteriza por una mala secreción de insulina y por una resistencia a la misma por fallo en los receptores de los tejidos periféricos y en la célula  $\beta$ .
- Diabetes Mellitus gestacional, que se desarrolla durante el embarazo
- Otros tipos de Diabetes Mellitus, que se desarrollan en el contexto de otras enfermedades o trastornos, o por mutaciones génicas (MODY)

#### 4.1.- DIABETES MELLITUS TIPO 1 (IDDM)

La diabetes de tipo 1, que afecta al 0.3% de la población mundial (52), está causada por una absoluta deficiencia en la producción de insulina como resultado de la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas. Puede aparecer de forma aguda durante la niñez, o gradualmente en el adulto (53).

Se puede decir que la IDDM es una enfermedad autoinmune, o al menos, que tiene un fuerte componente autoinmune, ya que los islotes presentan un infiltrado inflamatorio (insulitis), existe un fuerte vínculo con determinados alelos MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) y existen ciertos autoanticuerpos que reaccionan con autoantígenos de las células de los islotes (51).

La IDDM es, por lo tanto, consecuencia de la destrucción autoinmune progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas por parte de los linfocitos T. Pero los hechos que desencadenan esa destrucción celular aún no se han comprendido completamente. Se sabe que varios autoantígenos pueden desencadenar la autoinmunidad específica contra las células  $\beta$  (54).

De hecho, se han descrito tantos autoantígenos que se ha vuelto complicado identificar aquellos que son realmente los más importantes para el diagnóstico clínico de la enfermedad y los que realmente están involucrados en la respuesta autoinmune primaria y en el proceso autoinmune de la IDDM. Entre estos autoantígenos, identificados por reactividad del suero de pacientes con IDDM, se encuentran el sialoglicolípido (no es específico de célula  $\beta$ ), un antígeno de 38 KDa (localizado en las vesículas secretoras), el transportador de glucosa GLUT-2, un antígeno de 52 KDa

(parecido a una molécula del virus de la rubéola), otro antígeno de 150 KDa (asociado a la membrana de las células  $\beta$ ), la carboxipeptidasa H (se encuentra dentro de las vesículas secretoras de insulina), la proteína hsp 65, posiblemente la albúmina de suero bovino (BSA), las proteínas ICA12/ICA512 (también conocido como IA2) (identificadas dentro del islote), el receptor de insulina, la propia insulina (el único autoantígeno específico de células  $\beta$ ) o el GAD 65 (descarboxilasa del ácido glutámico; identificada en las células  $\beta$  de los islotes) (1).

Pero, además, el desarrollo de la IDDM se puede asociar también a ciertos factores ambientales, que combinados con los factores genéticos que hacen susceptibles a determinados individuos (poseen ciertos alelos MHC que les hacen propensos a la diabetes), hacen que se desencadenen los factores inmunes necesarios para disparar la acción de los linfocitos T. Por ejemplo, en humanos (donde las moléculas MHC se conocen como HLA), existen determinados haplotipos de HLA II (ej. DRB1\*0302 y DQA1\*0301) que hacen al individuo más propenso a sufrir IDDM. Existe una hipótesis que postula que, en estos individuos predispuestos genéticamente, el punto crítico sería la infección con un virus o un microorganismo, que dispararía la respuesta inmune frente a un antígeno que no es propio, pero que contiene una secuencia peptídica homóloga a un antígeno propio, activando así el proceso autoinmune contra este antígeno autólogo. Es lo que se conoce como *mimetismo molecular*. Por ejemplo, la proteína P2-C del virus *Coxsackie B4* tiene una secuencia muy parecida a los aminoácidos 247-279 del GAD 65 (55).

#### 4.1.1.- Principales autoantígenos

De todos los autoantígenos identificados, tan sólo una fracción minoritaria es realmente presentada al sistema inmune (55). Por lo tanto, se puede decir que existen tres autoantígenos principales:

- **GAD65**

La isoforma de 65 KDa de la descarboxilasa de ácido glutámico es uno de los autoantígenos principales de la IDDM. Concretamente, los epítomos conformacionales principales se encuentran en las porciones media y C-terminal. Está localizada en neuronas y también en islotes.



Entre el 60 y el 80% de los pacientes a los que se diagnostica IDDM presentan autoanticuerpos frente a GAD65.

- **IA-2**

Es un miembro de la familia de proteínas transmembrana tirosina-fosfatasa. Es una proteína transmembrana que se encuentra en las vesículas secretoras de células tanto endocrinas como neuronales. Su función, probablemente, esté relacionada con la secreción de insulina.

El 60-70% de los pacientes diagnosticados tienen autoanticuerpos frente a IA-2 y a GAD65.

- **Insulina**

Los epítomos conformacionales principales se encuentran en la cadena B, principalmente. Los autoanticuerpos frente a insulina están entre los primeros que aparecen en el estado pre-diabético y se suelen encontrar en niños de corta edad.

Entre el 30 y el 50% de los niños diagnosticados presentan estos autoanticuerpos.

Estos autoanticuerpos aparecen varios meses o años antes del establecimiento de la enfermedad y se usan tanto para el diagnóstico, como para la clasificación de los pacientes de IDDM (51). Sin embargo, se ha podido comprobar que es una sola de estas proteínas la que determina, al menos en su mayor parte, la aparición de los autoanticuerpos que terminan provocando el desarrollo de la IDDM, el GAD (52).

#### **4.1.2.- Papel del GAD65 en el desarrollo de la IDDM**

Se ha propuesto, por tanto, que la patogénesis de la IDDM depende de la respuesta autoinmune a un determinado autoantígeno (GAD65) que esta sobre-expresado y que es presentado de forma anormal al sistema inmune debido a alteraciones metabólicas o a daños en el islote pancreático (53). Esta teoría se basa en que, debido a varias posibles causas, se produce un daño en el sistema de oxidación-reducción mitocondrial, produciendo así un déficit de energía que afectaría directamente a lo que ellos denominan la “*red del GABA*”. Al no existir ATP suficiente para incluir el GABA en las microvesículas SLMVs, se produciría un aumento del mismo en el

citoplasma, lo que provocaría una perturbación en la *red de GABA*, generándose una acumulación de glutamato (precursor del GABA, a través de su decarboxilación por el enzima GAD).

La células  $\beta$  responderían al exceso de glutamato acumulado, con una sobre-expresión del GAD, que mantendría los altos niveles de GABA requeridos para sus funciones energéticas y paracrinas, ya que, como luego explicaré, el GABA puede entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en forma de succínico y contribuir así a la formación de ATP o puede incluirse en las vesículas para ser luego liberado al exterior de la célula  $\beta$  (sección 5.2).

La sobre-expresión de GAD65 puede significar su sobre-exposición en la membrana celular, debido a que GAD65 se localiza anclado a la membrana de las vesículas SLMVs, y cuando estas son excitadas, el enzima queda expuesto al exterior celular. Esto perturbaría la tolerancia inmunológica en aquellos individuos predispuestos genéticamente, iniciando una cascada de señales que podrían desembocar en la aparición de IDDM.

Como todas las células nucleadas del organismo, las células  $\beta$  poseen la molécula MHC de tipo I, por lo que son capaces de procesar el enzima GAD, que se encontraría sobre-expresado. De manera que habría una presentación más eficiente de fragmentos del autoantígeno en la superficie celular (a través de los MHC de clase I), lo que supondría la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Por otro lado, debido a la sobre-exposición de GAD en la membrana plasmática (como consecuencia de la elevada liberación del contenido de las SLMVs) se podría facilitar la captación e integración del enzima por los macrófagos (células presentadoras de antígeno), que se encuentran normalmente en el islote, y su posterior presentación a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (53). Una vez que tanto los CD4<sup>+</sup> como los CD8<sup>+</sup> específicos para GAD son reclutados al islote, la situación es propicia para que otras células proinflamatorias lleguen al islote, generando una cadena de eventos que llevan a la liberación de citoquinas y a la inflamación de la zona (insulitis). El resultado es la muerte de las células  $\beta$  por mecanismos de apoptosis, principalmente, aunque también puede ser que la necrosis tenga algún papel en la desaparición de estas células secretoras de insulina (51).

Por otro lado existe un trabajo del grupo de Yoon JW y col (54) en el que se ha desarrollado una línea de ratones NOD (ratones diabéticos no obesos) en la que han sido capaces de suprimir la expresión del GAD, específicamente en células  $\beta$  (GAD se sigue expresando en cerebro), a través de la producción de ratones transgénicos con un transgen antisentido de GAD65 y GAD67. La supresión total de la expresión de GAD boquea la generación de linfocitos T diabetogénicos y protege al islote del daño celular y al animal, por lo tanto, del desarrollo de la diabetes. Esto abre la posibilidad de varias terapias génicas que podrían, en algún futuro poner fin a la IDDM. Entre ellas, se encuentra la posibilidad de hacer que se expresen en el timo, antes del desarrollo del sistema inmune, los epítomos más inmunogénicos del GAD, de manera que el sistema inmune fuese tolerante al enzima y no provocase el desarrollo de la enfermedad. El mayor obstáculo a superar en este caso, sería la necesidad de insertar un transgen en la línea germinal, lo que supone hoy en día, un grave problema ético (52).

#### **4.2.- DIABETES MELLITUS TIPO 2 (NIDDM)**

La Diabetes Mellitus de tipo 2 (NIDDM) se suele desarrollar en la etapa adulta del individuo y es la forma más común de manifestación de esta enfermedad, por lo que se ha convertido en una epidemia a nivel mundial. De hecho, se estima que, mientras que en el año 2000 había 171 millones de personas con Diabetes Mellitus tipo 2, en 2030 habrá el doble, 366 millones (56).

Es el resultado de un defecto doble: existe una inadecuada secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  y existe también una resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos y en las propias células  $\beta$  (51).

El principal factor de riesgo de la NIDDM es la obesidad y la vida sedentaria. Pero ésta no es la causa última del desarrollo de ésta enfermedad, ya que el componente genético es muy importante para predisponer al paciente a sufrir diabetes.

Estos individuos presentan una disregulación de las células  $\alpha$  y  $\beta$ . De hecho, el primer signo de que la célula  $\beta$  falla, de que no funciona correctamente, es la pérdida selectiva de la primera fase de la secreción de insulina (56). Se ha especulado con que ese defecto de secreción en la primera fase pueda deberse a un problema en la preparación de los gránulos de insulina para liberarse. Como he explicado con

anterioridad, existe una estrecha relación entre los niveles de ADP y el control de la liberación de los gránulos. La diabetes de tipo 2 está asociada con defectos en el metabolismo de la glucosa (glicólisis, metabolismo oxidativo, debido a la acumulación de mutaciones mitocondriales con el paso de los años...) que afectan a la generación de ATP a expensas del ADP. De igual manera, la obesidad, al aumentar crónicamente los niveles circulantes de ácidos grasos no esterificados, puede afectar a la generación de ATP, reduciendo el cierre de los canales de  $K^+_{ATP}$  inducido por glucosa. Si, además, la célula  $\beta$  es incapaz de reducir los niveles citoplásmicos de ADP, se afectará la secreción inducida por glucosa tanto en la primera fase (desencadenamiento), como en la segunda fase de amplificación de la señal (44).

## 5.- ÁCIDO $\gamma$ -AMINO BUTÍRICO (GABA)

### 5.1.- UN POCO DE HISTORIA

En los años 50 se descubrió, por dos grupos de investigación independientes, que el GABA (ácido gamma-aminobutírico) era un aminoácido presente en tejido cerebral. Además se pudo comprobar que era capaz de activar el metabolismo de proteínas en el sistema nervioso central, que afecta al comportamiento del individuo y que actúa como el principal neurotransmisor inhibitorio (57). El GABA, mediante su acción a través de receptores específicos situados en las membranas de las células sobre las que actúa, es capaz de aumentar el flujo de iones cloruro a través de membranas excitables, produciendo así la hiperpolarización de las mismas e inhibiendo la liberación de más neurotransmisores por parte de estas células diana (58).

Posteriormente, en los años 70, Gylfe (59), en un estudio sobre la cantidad de aminoácidos presentes en los islotes, resalta la gran concentración que existe tanto de GABA, como de taurina, en los islotes de ratones ob/ob. Otros grupos como el de Gerber J.C. (58) o el de Taniguchi H. (60) han estudiado la presencia de GABA en tejidos no cerebrales. Así se ha encontrado GABA en pequeñas cantidades en pulmón, corazón, testículos y ovarios; en cantidades intermedias en bazo, hígado y estómago; y en grandes cantidades en tejidos como timo, glándula adrenal y **páncreas**. De hecho, mientras que la concentración de GABA en el SNC es de 1-10 nmol/mg, el órgano extracerebral con mayor contenido de GABA es el páncreas (40 pmol/mg), y concretamente, donde mayor concentración de GABA hay es en los islotes de Langerhans (190

pmol/mg) (58). Se ha comprobado también que en enfermedades tumorales de células  $\beta$  pancreáticas (insulinoma) el GABA se encuentra aún más concentrado (58, 60, 61).

La co-inmunolocalización de GABA e insulina en el islote pancreático de rata, supuso un descubrimiento importante, ya que se pudo afirmar que es precisamente en las células  $\beta$  donde está la mayor cantidad de GABA del islote (57). De hecho, en rata, la concentración de GABA en la célula  $\beta$  es 7 veces la concentración en el páncreas (2.51 mmol/Kg vs. 18.9 mmol/Kg) (61).

En un principio, no se sabía si el GABA del islote realmente era sintetizado por él mismo o si, debido a la gran cantidad de terminales nerviosos que irrigan el islote, tenía un origen exógeno. En estudios llevados a cabo con estreptozotocina, que destruye específicamente las células  $\beta$  pancreáticas en 24 horas, y microscopía electrónica, se pudo demostrar que el GABA tenía un origen endógeno y no exógeno. Si se eliminan específicamente las células  $\beta$  del islote, pero los nervios siguen intactos, la disminución de GABA reflejaría una destrucción de células  $\beta$  (y con ellas, del GABA y de su mecanismo de formación) (58,60). Hay que sumar a estos resultados el hecho de que tanto en islotes de rata como en insulinomas de rata o humano, además de altas concentraciones de GABA, también se ha encontrado una alta actividad del enzima GAD (descarboxilasa del ácido glutámico), que es el encargado de metabolizar el glutamato en GABA (60, 61).

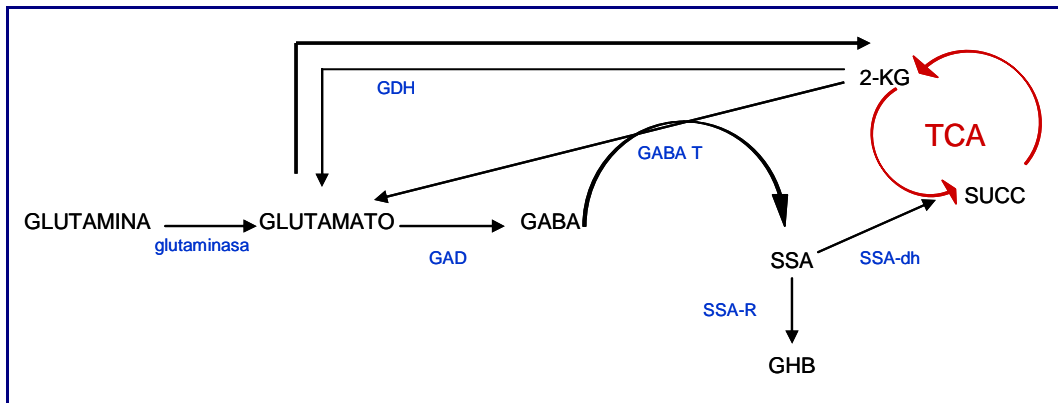
Lo que aún hoy en día no se ha podido resolver es el misterio que supone la función tanto del GAD, como del GABA en el islote pancreático, y más concretamente en la célula  $\beta$ . Existen dos teorías que no tienen por qué ser opuestas. Se ha propuesto que el GABA puede tener un papel importante como regulador paracrino de la secreción a través de su acción inhibitoria sobre las células  $\alpha$  o  $\delta$ . Pero también se ha propuesto un papel importante a través de su catabolismo en el *shunt* del GABA.

## 5.2.- EL SHUNT DEL GABA

Se llama así al conjunto de reacciones enzimáticas que comprenden el metabolismo del GABA, desde su formación a partir de glutamato hasta su degradación a succínico (62).

A partir del ácido glutámico, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es capaz de producir GABA. Y este glutámico se puede sintetizar por tres vías (figura 13):

1. Desde glutamina, a través de una glutaminasa mitocondrial, que lleva a cabo una desaminación.
2. Desde  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) producido en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que mediante la GABA transaminasa (GABA-T), se transamina con el propio GABA en semialdehído succínico (SSA) y glutámico.
3. A través de la glutamato deshidrogenasa (GDH), que en una reacción inversa podría sintetizar la formación de glutamato desde  $\alpha$ -cetoglutarato. En este caso, el origen último del glutamato, y por lo tanto del GABA, podría estar en la propia glucosa (63, 20, 49)).



**Figura 13:** Esquema representativo del *shunt* del GABA. GAD: descarboxilasa del ácido glutámico; GABA T: GABA transaminasa; SSA: semialdehído succínico; SSA-R: SSA reductasa; SSA-dh: SSA deshidrogenasa; GHB:  $\gamma$ -hidroxibutírico; SUCC: ácido succínico;  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -cetoglutarato; GDH: glutamato deshidrogenasa.

El ácido glutámico formado pasa entonces a GABA a través del enzima GAD, y este GABA se transamina con  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato y semialdehído succínico (SSA). El semialdehído succínico tiene dos destinos diferentes: ácido succínico, a través de la SSA-deshidrogenasa (oxidación del SSA) o  $\gamma$ -hidroxibutírico (GHB), a través de la SSA-reductasa (reducción del SSA) (64, 65, 66). Mediante la actividad SSA deshidrogenasa, el GABA, y en último lugar la glutamina, entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en forma de succínico, contribuyendo así a la formación de ATP y equivalentes reductores. Se ha conseguido purificar este enzima en rata y

humanos, por lo que se conoce bien su estructura tridimensional y su secuencia de aminoácidos (65). Por técnicas electroforéticas se ha determinado que la SSA reductasa es un enzima dimérico compuesto por dos subunidades idénticas de 56 KDa, cuyos sustratos fisiológicos son el semialdehído succínico, que se reduce a  $\gamma$ -hidroxibutírico, y el semialdehído del ácido malónico, que se reduce a  $\beta$ -alanina. A diferencia de la SSA deshidrogenasa, que usa como cofactor el  $\text{NAD}^+$ , el cofactor principal de la reductasa es el NADPH (64). Aunque se trata de un enzima reversible, a pH 7, el sentido principal de la reacción es el de formación de GHB (66).

El papel del GHB es bastante interesante, y por lo tanto, también lo es el papel de la SSA reductasa. Se sabe que la deficiencia de SSA deshidrogenasa en el sistema nervioso es una enfermedad autosómica recesiva que provoca un aumento de la concentración de GABA, lo que termina por causar un aumento del GHB en los fluidos orgánicos y una  $\gamma$ -hidroxibutírico-aciduria orgánica que puede provocar un retraso mental, motor y en el desarrollo del lenguaje (64). Por este y por otros efectos neurofisiológicos, el GHB ha tomado importancia en los últimos años y, sobre todo, es interesante el estudio del posible papel de este metabolito. Se conoce la existencia de transportadores específicos en las membranas neuronales y también de un sitio de unión específico en las mismas. Pero no existe un mecanismo definido para su posterior metabolismo y degradación. *In vivo*, el GHB se degrada gracias a que retorna a SSA a través de la SSA reductasa, que es capaz de funcionar en sentido contrario, aunque a baja velocidad, cuando el GHB alcanza concentraciones saturantes. De esta manera, finalmente, el GHB puede entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos a través de su posterior metabolización a succínico por la SSA deshidrogenasa (66).

Todo esto se conoce para las células neuronales, aunque debido a la similitud fisiológica entre estas células y las células  $\beta$ , es posible que gran parte de este metabolismo sea aplicable a las células pancreáticas. Se han propuesto 4 posibles funciones del *shunt* del GABA en las células  $\beta$  (62):

1. Circunvalar una parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, lo que produciría una disminución de la producción neta de energía en un 25%.
2. Producir GABA, que puede actuar como elemento paracrino o participar en la síntesis de insulina.

3. Constituir el camino de entrada del glutamato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para producir energía.
4. Mantener el *pool* de glutamato en la célula  $\beta$ , ya que por cada molécula de GABA que se elimina por transaminación, se genera una nueva molécula de glutamato.

Como la mayor parte de la glutamina que entra en las células se transforma en GABA, el metabolismo del mismo es de gran importancia. De todos los enzimas que participan en el *shunt* del GABA de los que más conocimiento se tiene son la GABA transaminasa y, sobre todo, el GAD. Sin embargo, otros enzimas como la SSA reductasa o la SSA deshidrogenasa han quedado relegados a un segundo plano y casi no hay datos sobre ellos (20).

### 5.2.1.- EL SHUNT DEL GABA EN LA CÉLULA $\beta$

A través de los estudios realizados por inmunofluorescencia, se ha podido determinar que los principales enzimas que regulan la cantidad de GABA (GAD y GABA transaminasa) se encuentran en grandes concentraciones en la zona medular del islote, es decir, en las células  $\beta$  (57), pero no se han encontrado ni en células  $\alpha$ , ni en células  $\delta$  (62). Y más concretamente, dentro de la célula  $\beta$ , a diferencia de las células del tejido cerebral, se ha inmunolocalizado la GABA transaminasa en los compartimentos mitocondriales, pero no en el citoplasma (67). Sin embargo, el enzima GAD presenta diferente localización según la isoforma de la que estemos hablando. De esta manera, la isoforma de 67 KDa de la descarboxilasa, se encuentra más en forma citoplásmica, mientras que la isoforma de 65 KDa, la más abundante en el islote pancreático, se encuentra asociada a la membrana de las vesículas SLMV (62). Ambas proteínas son solubles, pero GAD65 tiene la capacidad de unirse a otras proteínas (HSC70 y CSP) formando un complejo que la asocia a la membrana vesicular. También presentan diferencias en cuanto a su activación o inactivación, porque mientras que GAD67 se ve activada por la calcineurina, que la defosforila, y desactivada por la proteína kinasa A, que la fosforila, la isoforma de 65 KDa se presenta en su forma activa cuando está fosforilada (68).

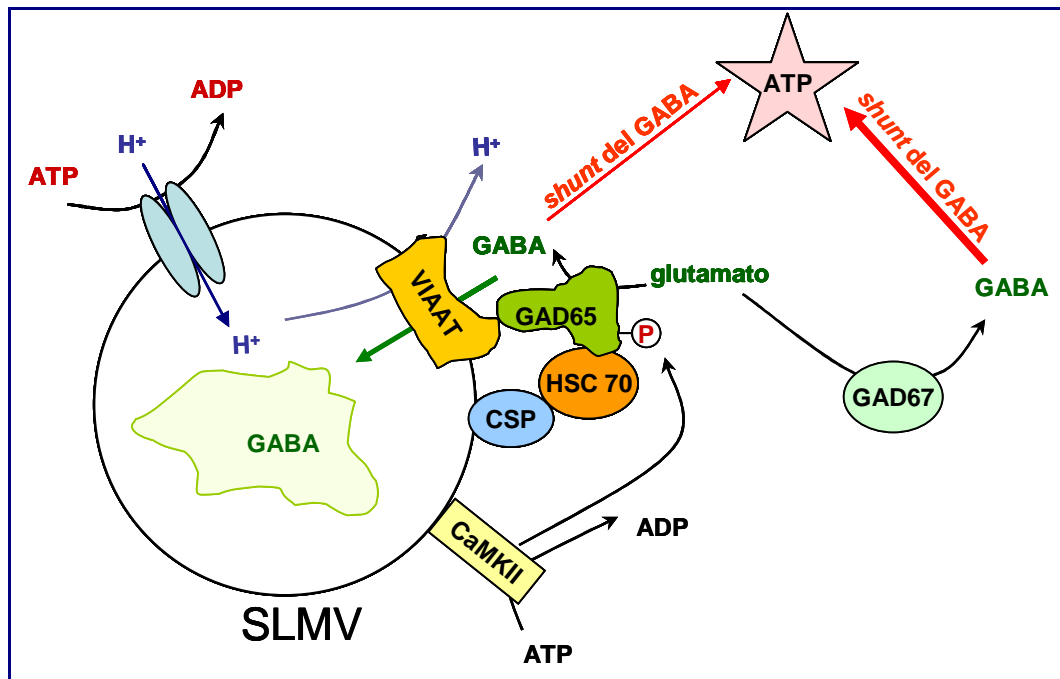
Se ha determinado que el GABA y la insulina colocalizan en las mismas células, las células  $\beta$ , pero que, en cambio, no aparece GABA ni en células  $\alpha$  ni en células  $\delta$ .



Además, se sabe que la mayor parte del GABA no se encuentra en los gránulos secretores de insulina, sino que está en un compartimento vesicular diferente, las SLMVs (62), es decir, que en principio no se libera junto a insulina. En un estudio llevado a cabo por el grupo de Reetz (69) se ha demostrado la colocación de GABA y GAD en las SLMV, lo que apoyaría la posibilidad de que el GABA se incluyese en las vesículas secretoras, análogamente a lo que ocurriría en las neuronas, con el fin de actuar como almacén y posteriormente, poder secretar el neurotransmisor al exterior de la célula  $\beta$ . En el mismo estudio, determinan que, aunque todas las SLMVs colocalizan con GAD65, no todas lo hacen con GABA. En los cultivos celulares llevados a cabo, tan sólo están “cargadas” aquellas vesículas que se encuentran en las prolongaciones terminales, zona con una población especialmente rica en SLMVs, que podrían corresponderse con aquellas vesículas que van a ser exocitadas.

### 5.2.2.- TRANSPORTADOR VESICULAR DE GABA

La inclusión del GABA en las SLMVs se hace a costa de un gasto de ATP, ya que existe un transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT), también conocido como transportador vesicular de GABA (VGAT), que es el encargado de introducir aminoácidos como glicina o GABA en las vesículas (70) (figura 14). VGAT es una proteína integral de membrana que, al menos en cerebro de rata, se encuentra asociada al complejo que une GAD65 a la membrana vesicular. En este complejo también se ha podido identificar a una proteína quinasa dependiente de calmodulina (CaMKII). Según estas observaciones, habría una asociación funcional y estructural entre la síntesis y la inclusión del GABA en las vesículas. Por un lado la CaMKII podría activar la isoforma de 65 KDa de GAD, de manera que se sintetizaría GABA a partir de glutamato. Este GABA recién formado (y no el ya existente en la célula) sería transportado al interior vesicular a costa de la salida de protones, que han sido previamente incluidos en las vesículas por la acción de una ATPasa vesicular (68). Se ha propuesto que el GABA formado por la isoforma soluble de GAD puede ser usado, no para incluirse en las membranas y consumir ATP, sino para metabolizarse en el *shunt* del GABA y así ayudar a mantener el gradiente de protones necesario para el transporte de GABA.



**Figura 14:** Representación esquemática del complejo formado por VIAAT y GAD65 en la membrana de las SLMVs en cerebro (68). El GAD65 formaría un complejo con CSP y HSP70 de manera que quedaría asociado a la membrana y a la proteína transportadora VIAAT, que es integral de membrana. El GABA formado, mayoritariamente por GAD67, se usaría para obtener energía, a través de su metabolización en el *shunt* del GABA. Hay evidencias de la presencia de VIAAT en las células  $\beta$ , por lo que este modelo es extrapolable al caso de las células secretoras de insulina.

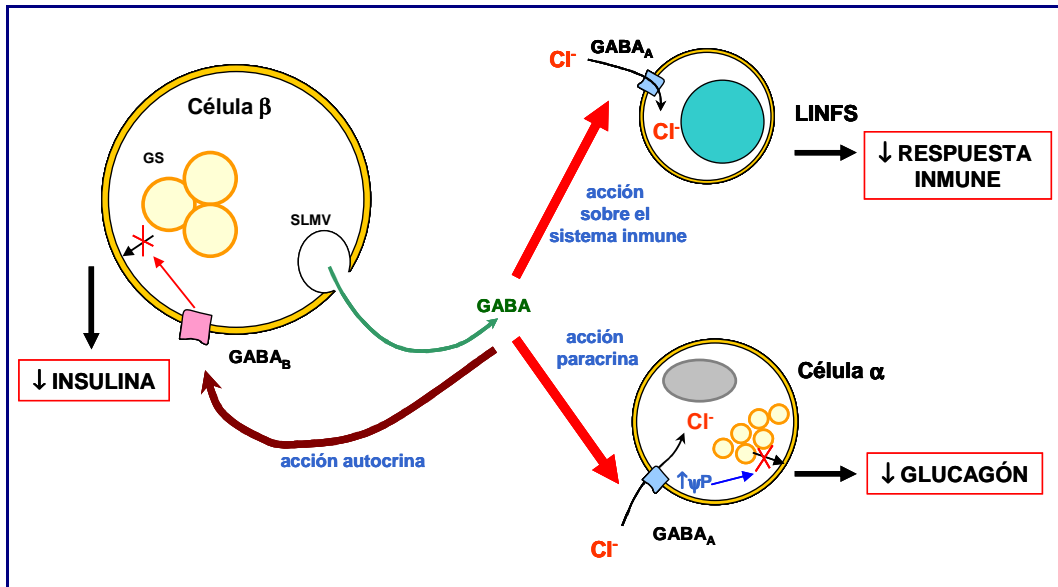
En un principio, Thomas-Reetz y *col* (71) establecieron la existencia de un transportador vesicular de GABA que se valía de un gradiente de protones para incluir el neurotransmisor en las SLMVs de las células  $\beta$ . Pero no fueron capaces de identificar esta actividad en las células  $\alpha$ . Sin embargo, posteriormente, el grupo de Chessler SD y *col* (70) fueron capaces de identificar esta molécula en las SLMVs de células  $\alpha$ , mayoritariamente, siendo la expresión en células  $\beta$  muy minoritaria. Posteriormente, el grupo de Hayashi M y *col* (72) confirmó la presencia del transportador en células  $\alpha$ , pero descartó su presencia en las células  $\beta$ . Por esta razón, propusieron que la entrada de GABA que se da en las SLMVs de las células  $\beta$ , que está regulada por el gradiente de protones, se debía a otra molécula distinta al VIAAT, pero que también era regulada por ATP. Sin embargo, en el año 2004 se publicó un estudio de Gammelsaeter R y *col* (73) en el que, mediante técnicas de inmunohistoquímica con oro, detectaron la presencia del

VIAAT tanto en las SLMVs como en los gránulos de secreción de las células  $\alpha$  y de las células  $\beta$ . En este caso, debido al diferente patrón de expresión de los dos aminoácidos que son sustrato de este transportador, GABA y glicina, en los dos tipos celulares, establecieron que, ya que en las células  $\alpha$  abunda la glicina, ésta compite con el GABA por el transportador y es finalmente empaquetada en las SLMVs y en los gránulos de secreción. Sin embargo, como en las células  $\beta$  abunda el GABA, pero no la glicina, es el GABA el que se empaqueta en las SLMVs. De esta manera, se propone que además de que el GABA tenga importancia en el funcionamiento del islote, la glicina liberada de las células  $\alpha$  junto al glucagón, también pueda tener un papel importante como elemento paracrino y autocrino. Finalmente, Suckow y *col* (74) en un estudio reciente, y tras usar una serie de anticuerpos dirigidos frente a diferentes epítopos localizados en las regiones N-terminal o C-terminal del VIAAT, han sido capaces de identificar el transportador en las células  $\beta$ . Concretamente, han identificado una de las dos isoformas que han sido detectadas dentro del islote. Se ha descrito la existencia de una forma de 57 KDa y otra de 52 KDa, que sería la variante truncada en el extremo N-terminal, resultado de la utilización de un sitio alternativo para el comienzo de la traducción. La variante de 57 KDa, y no la de 52 KDa, ha sido detectada en células INS 1 (línea tumoral de células  $\beta$  de rata), por lo que se ha establecido un modelo en el que las células  $\alpha$  expresarían la variante de 52 KDa, que debido a la no existencia del extremo N-terminal, podría dirigirse mejor a los gránulos de secreción en vez de a las SLMVs. La variante de 57 KDa, por lo tanto, sería la expresada en células  $\beta$ , donde sería capaz de asociarse a GAD65 y formar un complejo unido a la membrana de las SLMVs.

### 5.3.- TEORÍA DE LA ACCIÓN PARACRINA FRENTE A LA TEORÍA DEL CATABOLISMO DEL GABA

La función del GABA en el páncreas no ha sido aún claramente definida. Se le atribuyen acciones inhibitoras de la respuesta inmune e inflamatoria a nivel local, ya que se ha podido identificar el receptor GABA<sub>A</sub> en linfocitos (75). También se ha propuesto que pueda tener alguna función como regulador autocrino de las propias células  $\beta$  (76), aunque este efecto no se ha podido comprobar en todos los modelos estudiados (77). Igualmente, se ha propuesto un papel importante como regulador paracrino de la secreción de hormonas en las células vecinas del islote (75). A favor de esta última teoría está el hecho de que el flujo sanguíneo dentro del islotes hace circular la sangre, y

las sustancias en ellas disueltas, desde las células  $\beta$ , situadas en la zona central del islote, hacia la periferia, donde se encuentran las células  $\alpha$  y  $\delta$  (69).



**Figura 15:** Esquema de la posible acción del GABA fuera de la célula  $\beta$ . Es posible que ejerza un efecto supresor de la respuesta inmune local, a través de los receptores  $GABA_A$  de los linfocitos. También puede inhibir la secreción de glucagón a través de los receptores  $GABA_A$  de las células  $\alpha$  (acción paracrina) o puede autorregular la propia secreción de insulina (acción autocrina). (GS: gránulo de secreción).

La teoría de la acción paracrina se basa en que el GABA pueda tener un papel importante, una vez liberado de la célula  $\beta$ , sobre las células secretoras de glucagón y somatostatina (77). Se ha demostrado la presencia de receptores ionotrópicos ( $GABA_A$ ) en la superficie de células  $\alpha$  (78). De esta manera, el GABA liberado por las células  $\beta$  podría actuar sobre estos receptores  $GABA_A$  provocando una entrada del ión  $Cl^-$  y produciendo así la hiperpolarización de las células e inhibiendo la liberación de glucagón (79, 80, 81) (figura 15). Estudios recientes también sugieren la presencia de receptores metabotrópicos ( $GABA_B$ ) en el islote pancreático. De hecho, se ha descrito un agonista de este receptor que es capaz de inhibir tanto la secreción de insulina, como el aumento de calcio citoplásmico en la célula  $\beta$  (78, 76).

El efecto de la glucosa sobre la liberación de GABA es un tema controvertido, ya que según algunos autores, la glucosa aumentaría la liberación de GABA y según otros, la disminuiría. Existen estudios, a favor la primera hipótesis, realizados en células  $\beta$  de

ratón en cultivo, donde se registra, por HPLC, un aumento de la liberación de GABA en respuesta a una exposición prolongada a glucosa (81). Pero este tipo celular ( $\beta$ TC6) no es un buen modelo, ya que incluso la respuesta a glucosa está alterada (82). Adicionalmente, hay estudios que demuestran una liberación del GABA de las SLMVs tras una despolarización de la membrana celular o como consecuencia de un aumento de la concentración de calcio intracelular. Dichos estudios proponen que hay dos mecanismos de exocitosis paralelos, la liberación de insulina y la liberación de GABA (5-10 veces menor que la liberación de insulina), que llegarían incluso a compartir los mismos sensores de calcio. Sugieren también que aunque la liberación de GABA pudiese estar estimulada por la entrada de glucosa en la célula, estaría separada temporalmente de la secreción de insulina (79, 80, 76). Las SLMVs estarían separadas en dos grupos según su cinética de liberación. Las habría de liberación rápida, que responden a los primeros pulsos de despolarización. Y las habría de liberación lenta, que constituyen el pool de reserva. Las SLMVs son más pequeñas que los gránulos de insulina y además acumulan GABA por transporte activo, es decir, consumiendo ATP (80).

Sin embargo, el tema no deja de ser controvertido, porque el mismo grupo de investigación, que en trabajos previos había descartado la presencia de GABA en los gránulos de secreción de insulina (LDCV), ha publicado dos estudios, en 2006 (50) y en 2007 (83), en los que confirman la presencia de GABA también en un 15% estos compartimentos celulares. Braun M y col (83) afirman que la liberación de GABA por parte de las LDCVs supone más del 75% de todo el GABA liberado por la célula  $\beta$ . Aseguran que pequeñas moléculas como el ATP o el GABA, que se encuentran junto a la insulina en los LDCVs, son liberadas a través de los pequeños poros de fusión que se generan durante los procesos de “kiss-and-run” y pueden ejercer una importante influencia en la regulación paracrina y autocrina de la secreción de hormonas pancreáticas. El pequeño tamaño del poro de fusión sería el elemento regulador de la secreción de estas moléculas. El ATP o el GABA sí serían exocitados, mientras que la insulina, al no caber por el poro, no podría ser liberada. También se ha propuesto que, adicionalmente a esta exocitosis vesicular de GABA, existe una liberación basal de GABA, que tampoco asocian a la exocitosis de las SLMVs, y que además es independiente de glucosa. La existencia de ambas vías de liberación, la vesicular y la no vesicular, hace pensar en que el GABA pueda tener un papel importante en la

modulación tanto de la excitabilidad basal de las células de los islotes, como en la respuesta a la estimulación por parte de la glucosa.

A favor de la segunda hipótesis, se han publicado varios estudios en los que se comprueba que la glucosa disminuye la liberación de GABA al exterior celular (77, 75, 84). Se ha propuesto que sea el balance entre formación y catabolismo del GABA lo que determine la tasa de liberación del mismo. Tanto en presencia de glutamina exógena como de glucosa, se obtiene el glutamato necesario para que el enzima GAD lo descarboxile a GABA. Además, la glucosa generaría, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el  $\alpha$ -cetoglutarato necesario para que la GABA-T desaminase el GABA a semialdehído succínico (la GABA-T ha sido inmunolocalizada en las mitocondrias de las células  $\beta$  (67)). Posteriormente, el semialdehído succínico se transformaría en succínico y entraría así en el ciclo de Krebs. Es decir, que el metabolismo de la glucosa dirigiría parte del GABA hacia su catabolismo mitocondrial, reduciendo así el GABA disponible para ser liberado (75, 84).

En un principio, se puede descartar que esta maquinaria de degradación del GABA exista en otras células del islote, ya que tanto las células  $\alpha$  como las células  $\delta$  carecen de GABA transaminasa (67). Esto descartaría, por lo tanto, que el GABA fuese captado desde el espacio intercelular para su posterior metabolización en estas células, aunque no descarta la posible acción paracrina a través de los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub>.

## 6.- OTROS SECRETAGOGOS

Además de la glucosa, hay otras sustancias que son capaces de inducir la secreción de insulina en las células  $\beta$ . Hay estudios realizados acerca de la capacidad secretagoga de determinados aminoácidos como la leucina o la valina (85, 86) o de ciertos cetoácidos, como el  $\alpha$ -cetoisocaproico (KIC) o el  $\alpha$ -cetocaproico (KC) (87, 88) o de sustancias como la glutamina, que en combinación con otros metabolitos, son capaces de inducir la secreción de insulina (89, 90, 91, 20). Existen también sustancias análogas a las anteriores, que carecen de efecto alguno sobre la secreción de insulina. Es el caso del aminoácido norleucina, el cetoácido  $\alpha$ -cetoisovalérico (KIV) o el mismo pirúvico (91, 92).

Por otro lado, la curva de secreción de insulina frente a glucosa que se da en rata y en humano es igualmente bifásica, aunque la que se da en ratones es monofásica. Maechler y col (63), en un trabajo reciente explican que ésta diferencia se debe a la menor expresión de GDH (glutamato deshidrogenasa) en ratones. Asumen que la GDH trabaja en el sentido de producción de glutamato. Al entrar la glucosa en la célula habría un primer aumento de energía que produciría el primer pico de secreción, tanto en ratas como en ratones. Posteriormente, el  $\alpha$ -KG se transformaría en glutamato, favoreciendo así la aparición del segundo pico, en el caso de las ratas. En el caso de los ratones, con una expresión mucho menor del enzima GDH, esta segunda fase no aparecería. Por lo tanto, proponen que el glutamato sea un factor potenciador, más que activador de la secreción de insulina. Esta hipótesis está en consonancia con la propuesta en 1999 por el mismo grupo, en la que se postulaba que el glutamato podría ser el mensajero mitocondrial que asociase el metabolismo celular con la secreción de insulina (18). Esta teoría ha sido ampliamente rebatida en los años posteriores a su publicación, ya que aunque la GDH sí es capaz de actuar en el sentido de producción de glutamato, en condiciones fisiológicas, la dirección predominante es la de oxidación del glutamato (86).

Por otro lado, tanto la leucina, como su producto desaminado, el KIC, son estimuladores de la secreción de insulina, aunque no parecen compartir los mismos mecanismos. Mientras que el KIC es capaz de generar una curva bifásica de insulina, la leucina, por sí sola, únicamente es capaz de inducir una secreción monofásica (87). Sin embargo, si se estimulan los islotes con una combinación de leucina y glutamina, la curva sí es, entonces, bifásica (20). Otros cetoácidos como el KIV, o su producto aaminado, la valina, son incapaces de desencadenar la secreción de insulina (92).

Se sabe que las tasas de oxidación del KIC y de la glucosa son del mismo orden, y que son superiores a las de otras sustancias secretagogas, como el KMV (2-ceto-metil-valérico), y no secretagogas, como el KIV (87). Tanto el KIC como el KC, el KMV (potentes secretagogos, del orden del KIC) o la glucosa deben, entonces, compartir algún mecanismo común para activar la secreción de insulina. Este hecho llevó a sugerir la “hipótesis del combustible”, que supone que es secretagogo cualquier nutriente capaz de producir suficiente energía como para activar la secreción de insulina. Pero esta hipótesis tiene restricciones, y es que no vale cualquier aporte de energía. Sólo serían secretagogos los que superasen el umbral necesario para poder iniciar la liberación de insulina (89). Según lo que propone Malaisse en su trabajo de 1981 (89), esa es la razón

por la que la glutamina por sí sola no activa la secreción. Sin embargo, al trabajar junto a KIC o junto a leucina, potencia el efecto de los anteriores, aumentando así el aporte de energía.

Tanto para Malaisse (89, 90) como para Lenzen (88, 91, 92), la clave de todo el mecanismo de secreción se encuentra en el  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). Existe una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada que metaboliza el KIC a leucina o el KC a norleucina usando glutamato y produciendo  $\alpha$ -cetoglutarato. De esta manera, contribuyen al aumento de las reservas de  $\alpha$ -KG disponible en la célula. Por su parte, la leucina recién formada, es capaz de activar alostéricamente a la GDH, que transforma el glutamato aún disponible en más  $\alpha$ -KG. Si se administra glutamina junto a KIC, la secreción de insulina se dispara, ya que aumenta el glutamato disponible para oxidarse a  $\alpha$ -KG a través de la GDH. Por otro lado, la leucina recién formada se transaminaría otra vez a KIC, consumiendo así  $\alpha$ -KG, aunque este consumo se vería compensado por el aporte de la GDH. En el caso del KC, la norleucina no puede activar la GDH, pero es que tampoco se puede transaminar, porque se trata de un aminoácido lineal, que no es sustrato de la transaminasa de aminoácidos ramificados. Es decir, que la norleucina ni genera, ni consume  $\alpha$ -cetoglutarato, por lo que su producto desaminado, el KC sí es secretagogo. El KIV, sin embargo, como al transaminarse produce valina, que no puede activar a la GDH, pero sí volver a transaminarse y consumir  $\alpha$ -KG, no es secretagogo, ya que disminuye la cantidad neta de  $\alpha$ -cetoglutarato en la célula. La diferencia entre los diferentes  $\alpha$ -cetoácidos secretagogos estaría entonces en si se produce, o no, un rendimiento neto positivo en la producción de  $\alpha$ -KG, y en si el aminoácido generado por la transaminasa de aminoácidos ramificados a partir de los diferentes cetoácidos, es capaz, o no, de activar la GDH (92).

En contra de estas teorías que afirman que el KIC sólo ejerce su efecto indirectamente a través de la leucina, surgen estudios como los del grupo de Matchinsky (85, 86), que intentan demostrar que el KIC es independiente de la leucina y de su efecto sobre la GDH, que actúan por mecanismos distintos. La GDH se activa por la leucina y por ADP y se inhibe por GTP y ATP. Estas condiciones inhibitoras se dan cuando hay altas concentraciones de glucosa. De hecho, se sabe que aunque el KIC es capaz de activar la secreción de insulina tanto a altas, como a bajas concentraciones de glucosa, la leucina tan sólo lo hace a bajas concentraciones de glucosa. Por eso, proponen que la leucina actúa principalmente a través de la activación de la GDH, que tan sólo es posible



cuando la célula  $\beta$  no está expuesta a altas concentraciones de glucosa. Cuando la concentración de glucosa es alta y ésta se metaboliza, se genera GTP, que inhibe el enzima GDH e imposibilita la acción de la leucina (85, 86). Sin embargo, el efecto del KIC, no se ve inhibido por altas cantidades de glucosa, por lo que proponen que ejerce su efecto a través de una combinación de su transaminación a leucina, la consiguiente generación de  $\alpha$ -cetoglutarato y su propio catabolismo (existe una deshidrogenasa de cetoácidos ramificados que cataboliza el KIC hacia acetil coenzima A), aunque la oxidación de KIC no se considera importante para la activación de la secreción de insulina (porque existen aminoácidos como la valina o la isoleucina, que no son secretagogos, y que se oxidan con más eficiencia que el KIC) (85). De hecho, se ha podido demostrar que el KIC, por sí solo, es incapaz de generar un aumento de la producción de ATP en la mitocondria (93), lo que descarta la posibilidad de que sea a través de su metabolismo, como estimule la secreción de insulina. Esto haría necesario que el KIC se transaminase y produjese  $\alpha$ -cetoglutarato, para que pueda ejercer su efecto sobre la secreción de insulina (94).

Tanto el KIC como la leucina son metabolizados intramitocondrialmente. La leucina pasa a través de los transportadores L independientes de calcio. Y el KIC pasa por difusión pasiva en un simporte con protones. Esta salida de protones, provoca una alcalinización citoplasmática inicial (95). Tanto el KIC como la glucosa manifiestan un efecto bifásico sobre el pH intracelular. La célula, en un primer momento se alcaliniza (por el consumo mitocondrial de protones, debido al metabolismo de los dos compuestos) y posteriormente se acidifica (debido al aumento de la concentración de calcio intracelular, que provocará la exocitosis de los gránulos de insulina) (95, 96).

Igualmente importante es el hecho de que los cetoácidos, al igual que la glucosa, son capaces de hacer disminuir las cantidades intracelulares de GABA. Estudios acerca de este efecto han podido constatar que esta disminución no se debe a un aumento de su liberación, por lo que se apuesta por un aumento de su metabolismo. De hecho, la inhibición del GAD por el derivado metabolizado de la alilglicina (que detiene la producción de GABA a partir de glutamato) es capaz de potenciar la secreción de insulina que, ya por sí sola, desencadena la glucosa. En el estudio del efecto de los cetoácidos sobre otro enzima importante del “*shunt* del GABA”, la GABA transaminasa, los resultados son más difíciles de explicar. Los cetoácidos secretagogos inhiben el enzima, de manera que el GABA no podría metabolizarse. No obstante, los cetoácidos

con mayor poder secretagogo son los que menor efecto inhibitorio tienen sobre este enzima. De manera, que la menor inhibición de la GABA transaminasa, se reflejaría en una mayor capacidad secretagoga (97).



## OBJETIVOS

---



Dada la importancia que parece tener el GABA en la secreción de insulina, y ante la no determinación exacta de su papel en el interior de las células  $\beta$ , hemos desarrollado como objetivo general de esta tesis el estudio del sistema GABAérgico en los islotes pancreáticos de rata y, más concretamente, su relación con el mecanismo de secreción de insulina. Para ello hemos desarrollado una serie de objetivos:

1. Rastreo de la expresión génica, en islotes, de los enzimas que sustentan el *shunt* del GABA y que aún no han sido explorados: GABA transaminasa, semialdehído succínico deshidrogenasa y semialdehído succínico reductasa.
2. Determinación de la proporción de expresión del gen de la semialdehído succínico reductasa frente al de la semialdehído succínico deshidrogenasa, de manera que nos aporte información sobre el posible destino metabólico del GABA.
3. Estudio de la actividad enzimática de estos dos enzimas que metabolizan el semialdehído succínico. Caracterización en islotes y comparación con un tejido en el que abunde el sistema GABAérgico (cerebelo) y otro típicamente energético (hígado).
4. Estudio de la implicación del metabolismo del GABA en el mecanismo de secreción de insulina estimulado por nutrientes secretagogos: Modificaciones inducidas por glucosa y ácido cetoisocaproico.
5. Estudio de elevaciones controladas de la concentración intracelular de GABA utilizando precursores permeables sobre el mecanismo de secreción de insulina.
6. Caracterización de la liberación insular de GABA: exocitosis versus transporte. Identificación de GAD65 y VIAAT, proteínas asociadas con vesículas de almacenamiento de GABA, en células insulares.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---





## 1.- DISECCIÓN DE TEJIDOS Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se emplearon ratas Wistar macho de unos 275 g que fueron sacrificadas por decapitación 1 hora después de ser inyectadas con una solución de pilocarpina (48 mg/Kg de peso). Según el tipo de tejido se procedió a su disección:

### A.- ISLOTES

Los islotes se aíslan del páncreas de ratas macho Wistar por digestión con collagenasa P (actividad = 28.5 U) (Roche Diagnostics S.L. – Barcelona). Se divide el páncreas, aislado y troceado, en 2 ó 3 fracciones de 0.5 ml cada una (según el rendimiento final de islotes que se necesita para cada experimento). Se diluye cada fracción hasta 5 ml, con solución Hanks (137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.34 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.81 mM  $\text{MgSO}_4$ , 300 mM glucosa, 1.25 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 7.35, ajustado con  $\text{NaHCO}_3$  al 8.4%) y se digiere esta preparación durante 3 minutos a 37°C, en agitación, con collagenasa a una concentración de 28.5 U/5 ml, lo que, en función del lote de collagenasa, varía entre 6.5 ó 7.5 mg de collagenasa en 5 ml. Se mezclan las fracciones y, tras varios lavados, se aíslan los islotes en una lupa (Stemi SV6, Zeiss), diluyendo pequeñas fracciones del extracto digerido de páncreas en Hanks limpio, en una placa Petri de 6 cm de diámetro. Posteriormente, con una pipeta manual y artesanal, que nos permite seleccionar uno a uno los islotes, los vamos separando de los restos de exocrino digerido por la collagenasa. De esta manera, finalmente, tenemos islotes libres de exocrino y totalmente funcionales, ya que la cápsula que contiene a las células secretoras endocrinas se mantiene intacta.

### Experimentos fisiológicos y metabólicos

Se trabaja con los islotes íntegros aislados de la manera anteriormente explicada y se procede a agruparlos y someterlos a diferentes condiciones experimentales según sea requerido por cada experimento concreto.

### Actividad enzimática

En este caso es necesario usar un gran número de islotes, por lo que será preciso mezclar islotes procedentes de 2-3 ratas. Se lisan entonces 1200-1600 islotes, en 200  $\mu\text{l}$  del tampón de lisis correspondiente para cada actividad (Tabla 1), en un sonicador Branson 450: 4 ciclos de 10 pulsos cada uno a una intensidad de 1 y con una

frecuencia del 10 %. Se centrifugan ahora esos 200 µl que contienen el lisado de islotes, a 4°C durante 30 minutos a 42100 rpm (141500 g) para precipitar los fragmentos de membrana. El lisado se centrifuga en tubos de policarbonato de 1 ml de capacidad (Ref. 355657, Beckman), que precisan de adaptadores hechos a medida (taller de la facultad de físicas, UCM, Madrid) para el rotor 100.Ti de Beckman (ultracentrífuga Optima™ L-100 XP, Beckman Coulter). Se recupera el sobrenadante, donde están las proteínas solubilizadas.

	ACTIVIDAD SSA-R Y SSA-dh	ACTIVIDAD succ-dh	ACTIVIDAD 2-KG-dh
TAMPÓN EMPLEADO	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM, EDTA 2 mM, pH=7.2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM, EDTA 2 mM, pH=7.8	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM, EGTA 0.5 mM, pH=7.2
Leupeptina	60 µM	60 µM	60 µM
Aprotinina	0.0188 TIU/ml	0.0188 TIU/ml	0.0188 TIU/ml
PMSF	2 mM	2 mM	2 mM
β-mercaptoetanol	10 mM	10 mM	10 mM
TRITON X-100	0.5 %	--	0.5 %

Tabla 1: Tampones de lisis empleados para las distintas actividades enzimáticas. Triton X-100: Ref. X-100, Sigma.

### Extracción de RNA

En el caso de la extracción de RNA, se congelan rápidamente los islotes en hielo seco, se pesa el tejido congelado para tener un control posterior de la cantidad de material de la que partimos y se mantiene a -80°C hasta el momento de su utilización.

### B.- CEREBELO

Se disecciona el cerebelo y se selecciona la parte central (125 mg aproximadamente), desechando los extremos de los dos hemisferios.

### Actividad enzimática

En el caso de la medida de las actividades enzimáticas, se añade el tampón de lisis correspondiente a cada actividad enzimática (Tabla 1), de manera que la concentración final sea de 250 mg tejido fresco/ml. Se sonica 4 ciclos de 10 pulsos cada uno a una intensidad de 4 y con una frecuencia del 50%. El volumen final se pipetea a

tubos de policarbonato (Nº 355657, Beckman) y se centrifuga durante 30 minutos, 42100 rpm y a 4°C en una ultracentrífuga Optima™ L-100 XP (Beckman Coulter) (Rotor: 100.Ti). El sobrenadante se mantiene a 4°C hasta el momento de llevar a cabo los experimentos.

### Extracción de RNA

En el caso de la extracción de RNA, se congela rápidamente el tejido en hielo seco, se pesa y se mantiene a -80°C hasta el momento de su utilización.

## C.- HÍGADO

Se selecciona una fracción del extremo inferior derecho del hígado (125 mg aproximadamente).

### Actividad enzimática

Se añade el tampón de lisis para cada actividad enzimática (Tabla 1), de manera que la concentración final sea de 250 mg tejido fresco/ml. Se sonica 4 ciclos de 10 pulsos cada uno a una intensidad de 4 y con una frecuencia del 50%. El volumen final se pipetea a tubos de policarbonato (Nº 355657, Beckman) y se centrifuga durante 30 minutos, 42100 rpm y a 4°C en una ultracentrífuga Optima™ L-100 XP (Beckman Coulter) (Rotor: 100.Ti). El sobrenadante se mantiene a 4°C hasta el momento de llevar a cabo los experimentos.

### Extracción de RNA

En el caso de la extracción de RNA, se congela rápidamente el tejido en hielo seco, se pesa y se mantiene a -80°C hasta el momento de su utilización.

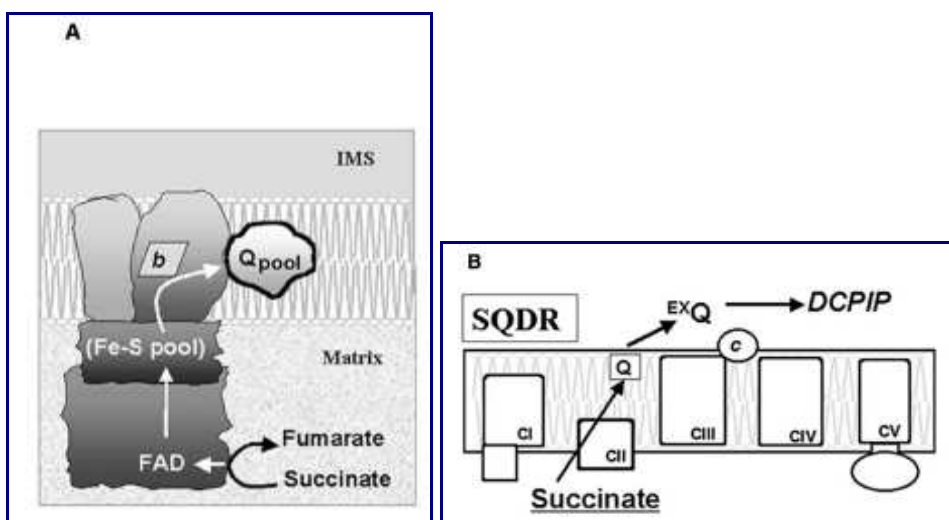
## 2.- ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 2.1.- VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

Se han valorado 4 tipos diferentes de actividades enzimáticas: la actividad semialdehído succínico deshidrogenasa (SSA-dh), la actividad semialdehído succínico reductasa (SSA-R), la actividad succínico deshidrogenasa (SUCC-dh) y la actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ -KG-dh). Las cuatro actividades se han valorado por un

método espectrofotométrico (espectrofotómetro UVIKON XL, Secoman, Francia). En el caso de las actividades SSA-dh, SSA-R y 2-KG-dh, el método está basado en la capacidad del NAD(P)H de absorber luz a una longitud de onda de 340 nm. En el caso de la succínico deshidrogenasa, el complejo mitocondrial II, el método de detección se basa en la capacidad que tiene el DCPIP (2,6-dicloro-fenol-indo-fenol) de disminuir su absorción a 600 nm cuando es reducido en la cadena respiratoria (figura 16) (98).

En el caso de las cuatro actividades enzimáticas se probó el efecto, tanto positivo como negativo, que pudiesen tener diferentes sustancias secretagogas y no secretagogas, tales como leucina (Leu),  $\alpha$ -ceto-iso-caproico (KIC), valina (Val),  $\alpha$ -ceto-iso-valérico (KIV),  $\alpha$ -ceto-metil-valérico (KMV),  $\alpha$ -ceto-butírico (KB), taurina (Tau), isobutírico (IB), 3-hidroxibutírico (3-OH-BUT), 2-hidroxibutírico (2-OH-BUT) o la gabaculina (GABACUL). Todos ellos se añadieron en el tampón de trabajo empleado para cada actividad enzimática, de manera que la concentración final alcanzada fuese 5 mM.



**Figura 16: Complejo mitocondrial II (succinato:ubiquinona oxidoreductasa).** A) representación de las cuatro subunidades del complejo y la vía de transmisión de electrones. B) Esquema del método usado para valorar la actividad de la succínico deshidrogenasa. El succinato es el donador de electrones y el DCPIP es el receptor (98).

Para calcular las actividades enzimáticas se usaron los coeficientes de extinción molar tanto del NADH a 340 nm ( $6.22 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), como del DCPIP a 600 nm ( $21 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **A.- ACTIVIDAD SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO DESHIDROGENASA**

Se extrae y se lisa el tejido que se quiera valorar como ha sido explicado anteriormente en un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, EDTA 2 mM (pH 7.2) con los inhibidores de proteasas correspondientes (leupeptina 60  $\mu\text{M}$ , aprotinina 0.0188 TIU/ml, PMSF 2 mM),  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, para mantener las condiciones reductoras, y TRITON X-100 0.5%, para favorecer la extracción de las proteínas de membrana.

Tras lisar y centrifugar el tejido (véase apartado 1), se mantiene el sobrenadante a 4°C hasta el momento en que sea valorada la actividad enzimática.

En una cubeta semi-micro de cuarzo se añade el homogenado del tejido que se quiera valorar (25  $\mu\text{l}$  para islotes o 12,5  $\mu\text{l}$  para cerebelo e hígado), posteriormente se añade el buffer específico para medir la actividad SSA-dh (470  $\mu\text{l}$  para islotes o 482.5  $\mu\text{l}$  para cerebelo e hígado): tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, EDTA 2 mM (pH 7.2),  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, oxamato 2 mM, para inhibir la lactato deshidrogenasa, rotenona 5  $\mu\text{M}$ , para inhibir el complejo I mitocondrial, TRITON X-100 0.5% y BSA 5 mg/ml. Además lleva el cofactor específico de la reacción:  $\text{NAD}^+$  (1.01 mM; en la cubeta quedará a una concentración final de 1 mM), que se reducirá en la reacción a NADH, produciendo un aumento de la absorbancia a 340 nm (66, 99, 100).

Se deja estabilizar la reacción durante 2 minutos a 37°C (dentro del espectrofotómetro). Posteriormente se añaden 5  $\mu\text{l}$  de semialdehído succínico (SSA) 20 mM, de manera que la concentración final será 0.2 mM. Se agita y se registra la variación positiva de la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos.

### **B.- ACTIVIDAD SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO REDUCTASA**

Se extrae y se lisa el tejido que se quiera valorar como ha sido explicado anteriormente en un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, EDTA 2 mM (pH 7.2) con los inhibidores de proteasas correspondientes (leupeptina 60  $\mu\text{M}$ , aprotinina 0.0188 TIU/ml, PMSF 2 mM),  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, para mantener las condiciones reductoras, y TRITON X-100 0.5%, para favorecer la extracción de las proteínas de membrana.

Tras lisar y centrifugar el tejido (véase apartado 1), se mantiene el sobrenadante a 4°C hasta el momento en que sea valorada la actividad enzimática.

En una cubeta semi-micro de cuarzo se añade el homogenado del tejido que se quiera valorar (25 µl para islotes o 12,5 µl para cerebelo e hígado), posteriormente se añade el buffer específico para medir la actividad SSA-R (470 µl para islotes o 482.5 µl para cerebelo e hígado): tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 2 mM (pH 7.2), β-mercaptoetanol 5 mM, oxamato 2 mM, rotenona 5 µM, TRITON X-100 0.5% y BSA 5 mg/ml. Además lleva el cofactor específico de la reacción: NADPH (53.2 µM; en la cubeta quedará a una concentración final de 50 µM), que se oxidará por la SSA-R a NADP<sup>+</sup>, produciendo una disminución de la absorbancia a 340 nm (66, 99, 100).

Se deja estabilizar la reacción durante 2 minutos a 37°C (dentro del espectrofotómetro). Posteriormente se añaden 5 µl de semialdehído succínico (SSA) 20 mM, de manera que la concentración final será 0.2 mM. Se agita y se registra la variación negativa de la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos.

### **C.- ACTIVIDAD α-CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA**

Se extrae y se lisa el tejido que se quiera valorar como ha sido explicado anteriormente en un tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, EGTA 0.5 mM (pH 7.2) con los inhibidores de proteasas correspondientes (leupeptina 60 µM, aprotinina 0.0188 TIU/ml, PMSF 2 mM), β-mercaptoetanol 10 mM, para mantener las condiciones reductoras, y TRITON X-100 0.5%, para favorecer la extracción de las proteínas de membrana, ya que se trata de una proteína mitocondrial.

Tras lisar y centrifugar el tejido (véase apartado 1), se mantiene el sobrenadante a 4°C hasta el momento en que sea valorada la actividad enzimática.

En una cubeta semi-micro de cuarzo se añade el homogenado del tejido que se quiera valorar (25 µl para islotes y cerebelo o 12,5 µl para hígado), posteriormente se añade el buffer específico para medir la actividad α-KG-dh (470 µl para islotes o cerebelo y 482.5 µl para hígado): tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, EGTA 0.5 mM (pH 7.2), oxamato 2 mM, rotenona 4 µM, coenzima A 0.5 mM -como cofactor-, TPP (tiamina difosfato) 0.3 mM -también como cofactor-, DTT (ditiotretitol) 2.5 mM -como agente reductor-, CaCl<sub>2</sub> 0.8

mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM y BSA 5 mg/ml. Además lleva el cofactor específico de la reacción: NAD<sup>+</sup> (2.5 mM), que se reducirá formando NADH, produciendo un aumento de la absorbancia a 340 nm (101, 102, 103).

Se deja estabilizar la reacción durante 2 minutos a 37°C (dentro del espectrofotómetro). Posteriormente se añaden 5 µl de α-cetoglutarato (α-KG) 0.5 M, de manera que la concentración final será 5 mM. Se agita y se registra la variación positiva de la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos.

#### **D.- ACTIVIDAD SUCCÍNICO DESHIDROGENASA**

Se extrae y se lisa el tejido que se quiera valorar como ha sido explicado anteriormente en un tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 2 mM (pH 7.8) con los inhibidores de proteasas correspondientes (leupeptina 60 µM, aprotinina 0.0188 TIU/ml, PMSF 2 mM) y β-mercaptoetanol 10 mM, para mantener las condiciones reductoras.

Tras lisar y centrifugar el tejido (véase apartado 1), se mantiene el sobrenadante a 4°C hasta el momento en que sea valorada la actividad enzimática.

En una cubeta semi-micro de cuarzo se añade el homogenado del tejido que se quiera valorar (25 µl para islotes y cerebelo o 10 µl para hígado), posteriormente se añade el buffer específico para medir la actividad SSA-R (470 µl para islotes o cerebelo y 485 µl para hígado): tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 2 mM (pH 7.8), rotenona 4 µM, ATP 0.2 mM como cofactor, DCPIP 80 µM como aceptor de electrones y BSA 5 mg/ml (99, 104).

Se deja estabilizar la reacción durante 12 minutos a 37°C (dentro del espectrofotómetro). Posteriormente se añaden 5 µl de succínico 1 M, de manera que la concentración final será 100 mM. Se agita y se registra la variación negativa de la absorbancia a 340 nm, durante 4 minutos.

#### **2.2.- VALORACIÓN FLUORIMÉTRICA**

Aprovechando la capacidad fluorescente del NAD(P)H, y su elevada sensibilidad respecto a sus propiedades espectrofotométricas, se valoraron también las



actividades semialdehído succínico deshidrogenasa (SSA-dh), semialdehído succínico reductasa (SSA-R) y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ -KG-dh). La metodología se desarrolló a partir de la usada para la técnica espectrofotométrica, pero a diferencia de esta, estas valoraciones se llevaron a cabo en una microplaca para fluorescencia (Costar®, Corning Incorporated), que fue medida en un lector de microplacas (Varioskan de Thermo Electron Corporation).

Las concentraciones de los diferentes tejidos fueron las mismas y se usaron los mismos tampones de lisis y los mismos tampones específicos para cada actividad enzimática. También se ensayó el efecto de diferentes secretagogos en estas condiciones, y todos ellos se usaron a una concentración final de 50 mM.

#### A.- ACTIVIDAD SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO DESHIDROGENASA

Se añaden 12.5  $\mu$ l del lisado de cerebelo o 25  $\mu$ l del lisado de islotes a 235  $\mu$ l del tampón de trabajo que contiene  $\text{NAD}^+$  1 mM y, en su caso, las sustancias de las que quisimos comprobar su efecto inhibitorio o potenciador (KB, KMV o KIC, todas ellas 50 mM).

Se introduce la placa en el lector de microplacas, se agita y se deja estabilizar a 37°C durante 3 minutos. Posteriormente se añaden 2.5  $\mu$ l del SSA 20 mM y se registra la variación de fluorescencia durante 10 minutos o hasta que la reacción se satura.

Para poder interpretar los resultados, es necesario interpolar las RFU (unidades de fluorescencia relativas) en una recta patrón de NADPH, en este caso. La ecuación de conversión utilizada para el NADPH es la siguiente:

$$\mu = \left( \frac{\text{---}}{\text{---}} \right) \times$$

#### B.- ACTIVIDAD SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO REDUCTASA

Se añaden 12.5 µl del lisado de cerebelo o 25 µl del lisado de islotes a 235 µl del tampón de trabajo que contiene NADPH 50 µM y, en su caso, las sustancias de las que quisimos comprobar su efecto inhibitorio o potenciador (KB, KMV o KIC, todas ellas 50 mM).

Se introduce la placa en el lector de microplacas, se agita y se deja estabilizar a 37°C durante 3 minutos. Posteriormente se añaden 2.5 µl del SSA 20 mM y se registra la variación de fluorescencia durante 10 minutos o hasta que la reacción se satura.

Para poder interpretar los resultados, es necesario interpolar las RFU (unidades de fluorescencia relativas) en una recta patrón de NADPH, en este caso. La ecuación de conversión utilizada para el NADPH es la siguiente:

$$\mu = \left( \frac{-}{\text{---}} \right) \times$$

### C.- ACTIVIDAD α-CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA

Se añaden 12.5 µl del lisado de cerebelo o 25 µl del lisado de islotes a 235 µl del tampón de trabajo que contiene NAD<sup>+</sup> 2.5 mM y, en su caso, las sustancias de las que quisimos comprobar su efecto inhibitorio o potenciador (KB, KMV o KIC, todas ellas 50 mM).

Se introduce la placa en el lector de microplacas, se agita y se deja estabilizar a 37°C durante 3 minutos. Posteriormente se añaden 2.5 µl del SSA 20 mM y se registra la variación de fluorescencia durante 10 minutos o hasta que la reacción se satura.

Para poder interpretar los resultados, es necesario interpolar las RFU (unidades de fluorescencia relativas) en una recta patrón de NADH, en este caso. La ecuación de conversión utilizada para el NADH es la siguiente:

$$\mu = \left( \frac{\quad}{\quad} \right) \times$$

### 3.- RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

#### A.- MARCAJE Y PURIFICACIÓN DE LA INSULINA RADIOYODADA

Para marcar (o radioyodar) la insulina porcina que usaremos como trazador radioactivo, se empleó la técnica de Hunter y GreenWood, basada en la oxidación del yoduro radiactivo a yodo atómico mediante la acción de la cloramina T. El yodo atómico se introduce en uno de los carbonos del anillo bencénico de alguno de los cuatro restos de tirosina de la cadena A (residuos 14 y 19) o B (residuos 16 y 26) de la molécula de insulina.

Tras 30 segundos, se detiene la acción oxidante de la cloramina T por la adición de metabisulfito sódico y yoduro potásico frío. La insulina marcada se separa de los demás productos de la reacción mediante cromatografía de filtración en gel (Bio-Gel® P10, Bio-Rad Laboratorios, Inc).

Se prepara la *mezcla de radioyodación* añadiendo, por orden, las siguientes soluciones:

Volúmen	Solución
25 µl	Tampón fosfato 0.5 M pH 7.5
5 µl	Insulina porcina 1 µg/µl (en HCl 0.03N)
10 µl	Cloramina T trihidrato 0.24 % (en tampón fosfato 0.5 M pH 7.5)
10 µl	Preparación comercial de <sup>125</sup> I Na (generalmente, 1m Ci/10 µl)

Se agita durante 30 segundos, tras los cuales se añaden 100 µl de yoduro potásico al 1% (en tampón fosfato 0.05 M) y 100 µl de albúmina bovina (BSA) al 20 % en tampón glicina 0.2 M pH 8.8.

Posteriormente, es necesario comprobar el porcentaje de incorporación del <sup>125</sup>I. Para ello, se precipitan proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 20 %:

Se mezclan 5 µl de la anterior *mezcla de radioyodación* con 5 ml de tampón glicina 0.2 M, de manera que la emisión producida se ajusta a 30000-50000 cpm en un volumen medido de 100 µl (contador gamma Wizar 1470 Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer). De esta nueva *mezcla* ya diluída se pipetea, en triplicado, 100 µl. Se añaden 100 µl de la solución BSA 10% y 800 µl de tampón glicina 0.2 M. Se mezcla y se añade 1 ml de TCA al 20%. Se mantiene la mezcla 15 minutos a 4°C y, posteriormente, se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Se aspira el sobrenadante y se mide la emisión radiactiva del precipitado.

Si comparamos ahora la emisión del precipitado de proteínas marcadas (100 µl de la *mezcla*) con la emisión de la *mezcla de radioyodación* diluída (100 µl), puede calcularse el porcentaje de incorporación:

$$\% \text{ de incorporación} = \left[ \frac{\text{cpm del precipitado}}{\text{cpm totales}} \right] \times 100$$

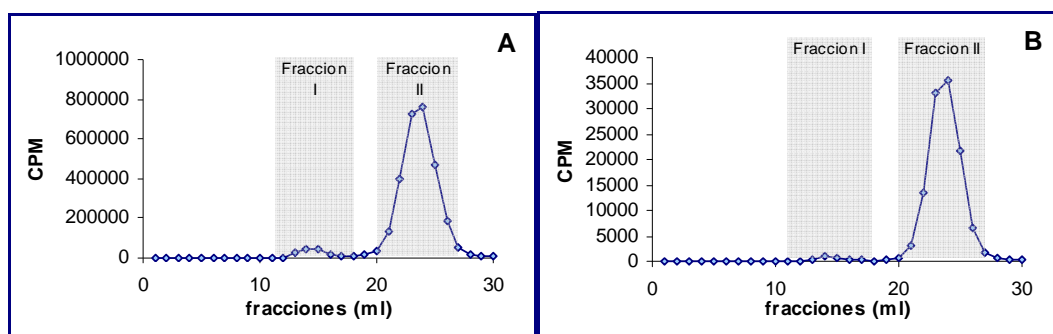
Entonces, la actividad específica de la nueva hormona marcada será:

$$\text{ACTIVIDAD ESPECÍFICA} = \frac{\% \text{ de incorporación} \times {}^{125}\text{I}}{\mu\text{ginsulina}}$$

La insulina porcina marcada y ya caracterizada se separa del resto de la *mezcla de radioyodación* por cromatografía de filtración en Bio-Gel® P-10 (diámetro de partícula 45-90 µm, en húmedo) hidratado en tampón glicina 0.2 M pH 8.8 y desgasificado durante toda la noche, mediante vacío. Se monta en una columna de cromatografía de 1.5 cm de diámetro, por 30 cm de altura (Pharmacia Fine Chemicals). En primer lugar, se pasa por la columna una alícuota de 200 µl de BSA 20%, para evitar la adhesión de la hormona marcada al vidrio de la columna. Se eluye con tampón glicina 0.2 M, pH 8.8. Posteriormente, se transfiere a la columna toda la mezcla de radioyodación y se eluye también con el tampón glicina. Se recogen fracciones de 1 ml (17 gotas) en un colector LKB, modelo 7000 Ultrarac. Se cuenta la radiactividad de cada tubo en un contador BIOSCAN/QC-2000 (figura 17A). Se seleccionan las fracciones que contienen la insulina inmunológicamente activa (normalmente, fracciones 21-26) y se les añaden 100 µl de

BSA al 20 %. De estas fracciones se seleccionan 5 µl y se vuelve a valorar su emisión fluorescente en un contador gamma (Wizar 1470 Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer). De una de ellas, se reserva el volumen necesario para cada experimento, según las condiciones posteriormente detalladas.

Todas las fracciones inmunológicamente activas se conservan congeladas y son las que se utilizarán para posteriores purificaciones, ya que es necesario purificar la hormona cada vez que se va a llevar a cabo un radioinmunoensayo. Con estas fracciones se procederá de igual manera. Se cargará en la columna un volumen procedente de las anteriores fracciones, que contenga el doble de las cuentas que se van a necesitar en cada experimento concreto (dependerá de las muestras a valorar). Se eluirá también con tampón glicina 0.2 M (figura 17B). Las fracciones aquí separadas se usarán directamente para preparar la solución de  $^{125}\text{I}$ -Insulina que se vaya a usar.



**Figura 17: Cromatograma obtenido al purificar la mezcla de radioyodación (A) ó una de las fracciones obtenidas de la fracción II de esta mezcla inicial (B).** La fracción I corresponde a la insulina degradada. La fracción II, a la insulina inmunológicamente activa. Habría una fracción II posterior (del mililitro 35 al 45), que correspondería al  $^{125}\text{I}$  no incorporado a la insulina porcina.

## B.- RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

### • MUESTRA

Se trabaja siempre con un volumen de muestra de 50 µl, que tras la adición de la hormona y del anticuerpo, se alcanzará un volumen final de 500 µl.

Según la condición experimental, será necesario hacer una dilución inicial de la muestra, que puede variar desde 1/2, hasta 1/1000. Todas ellas se llevarán a cabo en buffer glicina 0.2 M, pH 8.8, suplementado con BSA al 0.25%.

- **<sup>125</sup>I-INSULINA**

A cada una de las muestras que se deseen valorar será necesario añadir 250 µl de tampón glicina 0.2 M pH 8.8, suplementado con BSA al 0.25%, que deben contener 10000 cpm de insulina marcada. Por lo tanto, será necesario añadir tanta insulina marcada purificada como sea necesario para conseguir una actividad de 40000 cpm/ml en el volumen preparado para el número de muestras de cada experimento.

- **ANTICUERPO**

El suero GP-12 frente a insulina fue donado por el Dr. Janove Shelin del Departamento de Biología Celular Médica de la Universidad de Umeå (Suecia). A la dilución usada (1/400000) es capaz de combinar aproximadamente el 80% de la <sup>125</sup>I-Insulina, en ausencia de insulina fría.

A cada muestra se le añaden 200 µl del anticuerpo. Dado que el volumen de incubación final es 500 µl, se está diluyendo al anticuerpo 2.5 veces, por lo que la solución de anticuerpo que hay que preparar debe estar 2.5 veces más concentrada que la dilución final (1/400000). Por lo tanto, es necesario prepararla a una dilución 1/160000 en tampón glicina 0.2 M pH 8.8, suplementado con BSA 0.25%.

- **CURVA ESTÁNDAR**

La curva estándar nos permitirá calcular la relación entre <sup>125</sup>I-Insulina ligada al anticuerpo y la insulina fría total presente en las muestras. La curva estándar es una serie de concentraciones conocidas de insulina de rata (ref. 8013K, Linco Research, Inc) que se harán reaccionar con el anticuerpo en presencia de una cantidad constante de insulina radiyodada. Se añaden, por triplicado, 50 µl de cada una de las concentraciones de insulina de rata: 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2 ng/ml, 1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 0.2 ng/ml, 0.1 ng/ml y 50 µl del tampón glicina 0.2 M pH 8.8 (suplementado con BSA 0.25%), que actuará como cero. A todos ellos se les añadirán 200 µl del anticuerpo y 250 µl de la <sup>125</sup>I-Insulina.

Además es preciso preparar también un triplicado de la actividad total (AT), para lo que es necesario añadir a cada tubo 250 µl de la <sup>125</sup>I-Insulina. Nos servirá para conocer la cantidad real de insulina marcada que se ha añadido a cada tubo.

También es necesario un triplicado del blanco (B): 250 µl del tampón glicina 0.2 M, pH 8.8, BSA 0.25% y 250 µl de  $^{125}$ I-Insulina. Su función es la de valorar la eficacia del método de separación.

Adicionalmente, se preparan también tres tubos “referencia”, que sirven para determinar la reproducibilidad del ensayo, ya que se ponen 50 µl de una solución de insulina porcina a una concentración conocida (2 ng/ml) y se tratan como una muestra más.

**LAS MUESTRAS O ESTÁNDARES DEBEN DEJARSE INCUBANDO  
CON EL ANTICUERPO Y LA  $^{125}$ I-INSULINA DURANTE 2 DÍAS**

- **SEPARACIÓN DE LA INSULINA LIBRE DE LA LIGADA AL ANTICUERPO**

Se utiliza carbón activo (Charcoal), que adsorbe la insulina libre, dejando en solución el complejo antígeno-anticuerpo. Se prepara una suspensión de charcoal-dextrano (3 % de charcoal (ref. 05120, Fluka) y 0.25% de dextrano T-70 (ref. 17-0280-01, Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) en tampón glicina 0.2 M pH 8.8) y se añaden 250 µl a cada tubo, a excepción de los rotulados como AT.

Se mantienen a 4°C durante 45 minutos, tras lo cual se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y se mide la radioactividad en un contador gamma (Wizar 1470 Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer).

- **CÁLCULO DE LA CURVA ESTANDAR**

La versión de Rodbard de ajuste logístico de 4 parámetros ha demostrado ser un modelo satisfactorio para el ajuste de la curva estándar. Se trata de una función matemática semi-empírica que corrige las limitaciones de la transformación Logia-Log, que es uno de los métodos que mayor atención ha suscitado a la hora de representar datos de radioinmunoensayo. En la versión de Rodbard se emplean todos los datos experimentales disponibles para la estimulación de la respuesta a dosis cero ( $F_0$ ) y a dosis infinita (NSF) (Figura 18).

$$Y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D$$

X = variable independiente (dosis)

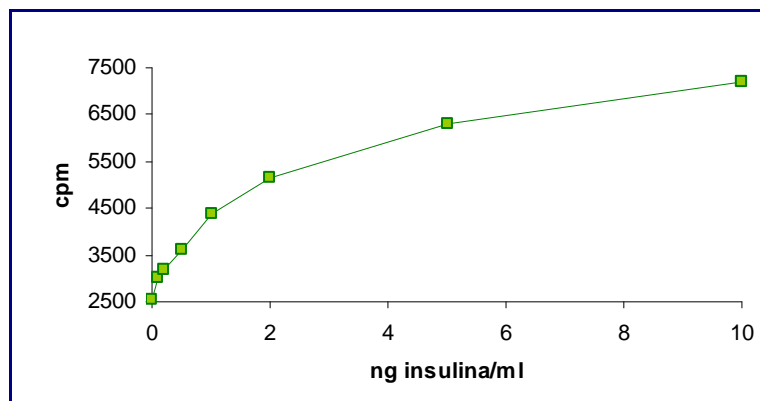
A = respuesta a dosis cero (F0)

B = pendiente de la curva

C = ED<sub>50</sub> (valor de x que origina una respuesta que es la mitad entra A y D)

D = respuesta a dosis infinita (NSF)

Y = variable dependiente (respuesta en cpm)



**Figura 18: Curva estándar de insulina.** Ajuste siguiendo el modelo logístico de Rodbard. La insulina libre es absorbida por el charcoal-dextrano y precipita. La hormona unida al anticuerpo queda en suspensión y es eliminada tras la centrifugación de la mezcla. Por lo tanto, lo que se valora es la emisión radiactiva (cpm) de la insulina libre.

### C.- MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA

Se hacen 3 grupos de 10 islotes, por cada condición experimental y rata, que se incuban, a 37°C durante 1 hora, en 1 ml de medio Krebs-Ringer bicarbonato (KRBH) (115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.56 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>) (Krebs-Ringer tamponado con NaHCO<sub>3</sub> 0.5 mM y Hepes 20 mM y suplementado con 0.5% (w/v) de albúmina (Albumin, fraction V fatty acid free. Ref. 10775835001, Roche Diagnostics, USA)) específicamente suplementado (glucosa, cetoácidos, inhibidores metabólicos, etc.) para cada experimento.



Posteriormente, se retiran 800  $\mu\text{l}$  del medio de incubación y con ello, diluido adecuadamente para cada situación, se lleva a cabo una determinación de la cantidad de insulina secretada mediante radioinmunoensayo.

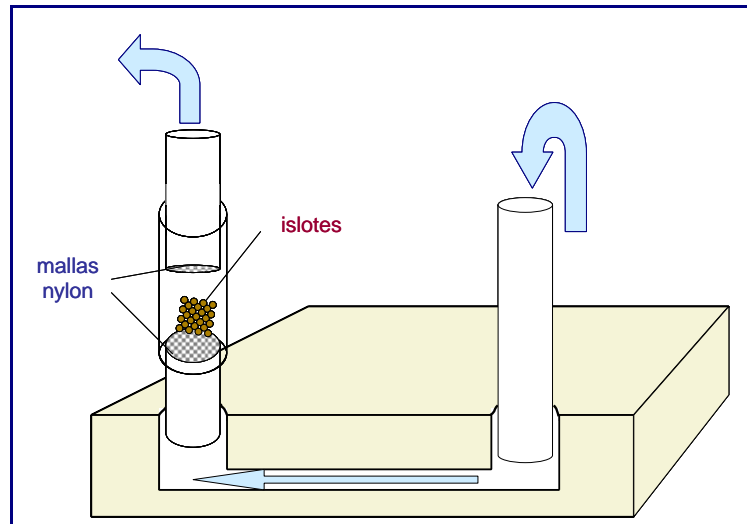
Según la condición experimental, es necesario llevar a cabo distintas diluciones. Así, por ejemplo, si se trabaja con glucosa 0 mM o con glucosa 5 mM, no es necesaria ninguna dilución. Si se trabaja con glucosa 10 mM, la dilución será 1/10. Si es glucosa 20 mM, 1/20, y así para cada condición específica.

#### **D.- MEDIDA DEL CONTENIDO DE INSULINA**

A cada grupo de 20 islotes se le añaden 100  $\mu\text{l}$  de etanol 77%-HCl 1% y se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de llevar a cabo la medida radiométrica. Para valorar el contenido de insulina mediante radioinmunoensayo es necesario diluirlo 1000 veces.

#### **4.- PERIFUSIÓN**

De cada rata se aíslan dos grupos de 40 islotes cada uno. Se colocan en las cámaras de perfusión, que están provistas de 2 mallas de nylon, una inferior, sobre la que se depositan los islotes, y otra superior, que impide que los islotes salgan de la cámara (figura 4). Cada grupo se expone a una condición diferente, una control y la otra con la condición experimental que corresponda a cada experimento.



**Figura 19: Esquema de la cámara de perfusión, delimitada por dos membranas de nylon.** Las flechas indican la dirección del medio (KRBH) que va a perfundir un grupo de 40 islotes.

Los islotes son perfundidos por Krebs-Ringer bicarbonato (KRBH), durante un total de 95 minutos a una temperatura constante de 37°C. Se somete a los islotes a un flujo constante de 0.5 ml/min. Durante los primeros 45 minutos se les expone a las condiciones basales de experimentación, lo que permite que se estabilicen. De este periodo tan sólo se recogen fracciones de 0.5 ml durante los últimos 15 minutos. Transcurrido este periodo de estabilización, se hace que pase, por la cámara de perfusión, KRBH con las condiciones control o experimental, según se trate del grupo control o del experimental. De este periodo se recogen fracciones de 0.5 ml durante los 30 minutos que constituyen el periodo de estimulación. Finalmente, se vuelve a someter a los islotes a un flujo constante del medio basal, para recuperar así las condiciones iniciales. Durante 25 minutos se siguen recogiendo fracciones de este último medio perfundido (figura 20).



**Figura 20: Esquema de la perfusión.** Se representan los tres periodos marcados por el cambio de medio que perfunde a los islotes. Se representan en los cuadros naranjas los periodos de tiempo durante los que se recogen fracciones de 0.5 ml, es decir, el medio perfundido cada minuto.

De las alícuotas recogidas cada minuto, se selecciona una fracción de 50  $\mu$ l, que posteriormente será medida por radioinmunoensayo.

## 5.- MEDIDA DE AMINOÁCIDOS

Los islotes se agrupan en tres grupos de 30 islotes por rata y se incuban durante 1 hora, a 37°C, en 70  $\mu$ l del medio correspondiente en cada caso. Transcurrido ese tiempo se reservan 50  $\mu$ l de ese medio de incubación o se elimina totalmente, en función de que se quiera estudiar la liberación o sólo el contenido. En cualquier caso, posteriormente, se lavan los islotes 2 veces con PBS y se les añaden 50  $\mu$ l de sulfosalicílico al 35% (p/v) (Ref. S-2130, Sigma). Se mantienen 24 horas a 4°C y después se congelan.

Las determinaciones fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Rafael Martín del Río, en el Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal. Se separaron entre 12 y 14  $\alpha$ -aminoácidos (dependiendo de si se midieron o no L-leucina y  $\beta$ -alanina) presentes en islotes pancreáticos. Se separaron por HPLC en una columna C18 de fase reversa y se cuantifican por fluorescencia, previa derivatización con o-ftaladialdehído (OPA).

## 6.- WESTERN BLOTTING: INMUNOTRANSFERENCIA

### A.- PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Como las proteínas que estamos buscando son proteínas ancladas a la membrana celular, como es el caso del GAD65, o son proteínas integrales de membrana, como es el caso del transportador VIAAT, es necesario usar un tampón de lisis que además de preservar intactas las proteínas, sea capaz de extraerlas de las membranas. Por eso usamos un tampón RIPA, que está compuesto por: PBS 1% (v/v), NP-40 1% (v/v), deoxicolato sódico 0.5% (p/v), SDS 0.1%(p/v) y PMSF 1 mM.

Por cada 200 mg de tejido se añade 1 ml del tampón y por cada 2200 islotes se añaden 200  $\mu$ l. Los homogenados se incuban en hielo durante 2 horas sonicando la muestra cada 20 minutos (10 pulsos a una intensidad de 1 para islotes o de 4 para

cerebelo. Y con una frecuencia del 10 % para islotes o del 50% para cerebelo) (sonicador Branson 450). Se centrifuga a 4°C durante 30 minutos a 40000 rpm para precipitar los fragmentos de membrana. Se recupera el sobrenadante donde están las proteínas solubilizadas, tanto las citoplasmáticas como las anteriormente integradas en membrana. El extracto se alícuota y se mantiene a -70°C tras valorar el contenido proteico (descrito posteriormente).

Antes de llevar a cabo la electroforesis (primer paso de separación del Western blotting) es necesario diluir las muestras para que no se sobrepasen los 30-35 µg de tejido total en los 20 µl de muestra “preparada” que se aplicarán (teniendo en cuenta que un tercio de ese volumen se corresponde con el tampón de aplicación). Por lo tanto, de los 20 µl que se cargan en el gel, 2/3 corresponden a la muestra (13.33 µl), cuya concentración no debe sobrepasar los 2.6 µg/µl (35 µg/13.33 µl). El 1/3 restante del volumen que se aplica en el gel corresponde al tampón de carga, que se prepara 3 veces concentrado:

- ▶ Tampón Tris–HCl 180 mM, pH 6.8
- ▶ Glicerol al 30 % (v/v)
- ▶ Azul de bromofenol al 0.15 % (p/v)
- ▶ SDS al 2% (p/v) (Ref. L-4390, Sigma)
- ▶ β-mercaptoetanol al 6% (v/v)

## B.- SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Partiendo de una solución inicial de acrilamida al 30% (p/v) y bisacrilamida al 0.8% (p/v) (30% acrilamide/bis 37.5:1. Ref. 161-0158. Bio-Rad laboratorios, Inc), se prepara un gel separador al 10% (pH 8.8) sobre el que se prepara otro gel concentrante al 4% (pH 6.8) (tabla 2).

(1º) Gel separador	Sol. A	Tris pH 8.8	Tris pH 6.8	SDS 10%	H <sub>2</sub> O	TEMED 5%	APS	Vol. total
	3330 µl	3750 µl	---	100 µl	2370 µl	150 µl	300 µl	10 ml
(2º) Gel concentrante	Sol. A	Tris pH 8.8	Tris pH 6.8	SDS 10%	H <sub>2</sub> O	TEMED 5%	APS	Vol. total
	530 µl	---	460 µl	40 µl	2610 µl	240 µl	120 µl	4 ml

**Tabla 2: Volúmenes que hay que añadir para preparar dos geles completos.** En primer lugar, se deja polimerizar el gel separador. Previamente, se añade un pequeño volumen de isopropanol

para conseguir alinear el frente. Una vez polimerizado, se elimina por sucesivos lavados con agua Milli-Q. El gel concentrante es necesario añadirlo en exceso, de manera que, al insertar el peine que servirá de molde para los pocillos, no quede ninguna burbuja de aire. Las soluciones a las que se hace referencia en la tabla son las siguientes:

- **Solución A:** acrilamida al 30 % (p/v) y bisacrilamida al 0.8 % (p/v) en agua destilada
- **Solución B:** Tris 1.0 M, pH 8.8.
- **Solución C:** Tris 1.0 M, pH 6.8
- **Persulfato amónico (APS):** 15 mg/ml en agua destilada. Se prepara en el momento y es un agente generador de radicales libres
- **TEMED:** (tetrametiletilendiamina) catalizador de la reacción de polimerización

Cuando hayan polimerizado, se montan en el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratorios, Inc) y se establece el amperaje a 50 mA (25 mA/gel) (fuente de alimentación Power Pac<sup>TM</sup> 3000 Power Supply, Bio-rad Laboratorios, Inc). Se dejan correr los geles a 4°C durante 45 minutos, hasta que el frente de Azul de Bromofenol salga del gel, lo que nos permite que se separen bien todas las bandas que componen el patrón coloreado de pesos moleculares (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> All Blue Standard, Ref. 161-0373, Bio-Rad Laboratorios, Inc). Para llevar a cabo la separación electroforética se usa el tampón de electroforesis (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 200 mM, y 0.1% (p/v) SDS).

Posteriormente se monta el “sándwich” para la transferencia de proteínas a la membrana de PVDF, previamente hidratada en metanol (1 minuto), lavada en agua Milli-Q (2 minutos) y equilibrada, al menos durante 15 minutos, en el tampón de transferencia. Se transfiere a 4°C durante 2 horas a 125 V constantes ó durante 30 minutos a 350 mA constantes. El tampón empleado ahora es el de transferencia (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v) (Methanol gradient HPLC grade. Ref. ME03062500, Scharlau Chemie. SA)).

Se introduce la membrana en solución de bloqueo (leche en polvo desnatada Central Lechera Asturiana no suplementada) al 5% y azida sódica (Ref. K15481588, Merck) al 0.1% en TBS) y se deja durante toda la noche a 4°C ó durante 90 minutos a 37°C.

Si se ha bloqueado a 37°C, se incuban las membranas con los anticuerpos primarios durante toda la noche. Si, por el contrario, se han bloqueado toda la noche, es a

la mañana siguiente cuando se incuban las membranas durante 2 horas a temperatura ambiente, con los dos anticuerpos primarios, uno monoclonal frente a  $\beta$ -actina (Ref. A5316, Sigma) - que se usará como referencia y como control de una buena transferencia y de un correcto funcionamiento de la inmuno-detección – y el otro policlonal, frente a GAD65/67 (Ref. AB1511. Chemicon Internacional). En el caso de la detección de VIAAT, se usaron dos anticuerpos distintos, que están dirigidos frente a distintos péptidos de una misma molécula. Por un lado, se usó un anticuerpo de Chemicon (Ref. AB5855) que está dirigido frente a un péptido de 17 aminoácidos de la región C-terminal, y está hecho en cabra. Y por otro lado, se usó un anticuerpo fabricado por el Dr. Bruno Gasnier del Instituto de Biología Físico-Química de Paris (Francia) que está dirigido frente a un péptido de 127 aminoácidos de la región N-terminal y está hecho en conejo blanco New Zealand (105, 106).

Tras 4 lavados de 10 minutos con TBS con Tween-20 (Ref. P-9416, Sigma) al 0.1%, se lleva a cabo la incubación, durante 1 hora, con el anticuerpo secundario específico para cada especie. Pero en nuestro caso, como para cada inmunodetección incubamos la misma membrana con dos anticuerpos frente a moléculas distintas ( $\beta$ -actina y la proteína de estudio en cada caso), que han sido inducidos en especies distintas, hemos usado la proteína A de la membrana de *Staphylococcus Aureus*, unida al enzima HRP (*Horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante). La proteína A tiene la propiedad de unirse a la fracción constante de las isoformas IgG e IgM de, prácticamente, todas las especies animales. En este caso, la dilución de proteína A (1/5000) no se prepara en solución de bloqueo, ya que contiene azida sódica, que es un inhibidor del enzima HRP. Por lo tanto, la dilución de la proteína A se lleva a cabo en TBS-Tween 0.1%. Tras la hora de incubación, se realizan 4 lavados de 10 minutos con TBS-Tween 0.1%

El revelado se lleva a cabo con el kit comercial de Amersham Bioscience para HRP: Amersham ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System (Ref:RPN 2109, GE Healthcare UK) , según las indicaciones del fabricante. Se incuban las membranas, durante 1 minuto, con la mezcla de reactivos A + B (1:1). Transcurrido ese tiempo, se elimina el líquido revelador por completo y se expone, en oscuridad, la membrana, ahora quimioluminiscente, frente a una película fotográfica (CURIX RP2 PLUS. Medical X-Ray Film. Ref: ENKMV 100 NIF, de 18x24 cm. AGFA) durante un periodo de tiempo que varía entre 5 y 20 minutos según la proteína a detectar.

## 7.- INMUNOHISTOQUÍMICA

Se utilizaron ratas Albino Wistar de 250 g, que fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (90 mg/Kg, i.p.), xylazina (10 mg/Kg, i.p.) y atropina (0.05 mg/Kg s.c.).

Se realizó una perfusión intracardiaca según el siguiente protocolo: lavado con 100 ml de tampón fosfato (PBS 0.12M, pH 7.4), seguido de fijación en paraformaldehído 4%-glutaraldehído 0.5% en PBS. Las muestras de tejido pancreático permanecieron en el mismo fijador empleado para la perfusión durante 12 horas y, posteriormente, se lavaron durante 24 horas en PBS.

La deshidratación se realizó en etanol a concentraciones crecientes, hasta etanol absoluto. Se aclaró el tejido en butanol 2 veces, durante 2 horas, y 1 vez, durante 48 horas. A continuación se realizó la inclusión en parafina, según los procedimientos convencionales. Se realizaron cortes de tejido de 6  $\mu$ m y se montaron las secciones en portaobjetos recubiertos de 2-aminopropil trietoxisilano y se secaron a 37°C durante 24 horas.

El desparafinado se realizó en xilol (3 veces, 10 minutos) y la deshidratación tuvo lugar en etanol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua Milli-Q:

- Etanol 100% → 5 minutos
- Etanol 90% → 5 minutos
- Etanol 80% → 5 minutos
- Etanol 70% → 5 minutos
- Milli-Q → varios cambios

La recuperación de la antigenicidad se realizó mediante calor, por el siguiente procedimiento: calentado en olla express durante 2 minutos a máxima presión. Enfriamiento rápido en la olla (bajo el chorro de agua). Reposo de las muestras en el tampón citrato, con la olla cerrada, durante 10 minutos, y con la olla abierta durante otros

10 minutos. Lavar los cortes rápidamente en agua Milli-Q y, posteriormente, en TBS pH 7.5, 2 veces, durante 5 minutos.

Para bloquear las reacciones inespecíficas se llevó a cabo una preincubación de 30 minutos en una solución de suero normal de burro al 3% (NDS) adicionado con Triton X-100 al 0.05%, en TBS pH 7.5 (TBS-NDS-T).

Posteriormente se incubaron los cortes, toda la noche, a 4°C, con el anticuerpo primario. El anticuerpo frente a VIAAT (Chemicon. Ref: AB5855) se preparó a una dilución 1:1000 en TBS-NDT-T, previamente diluido 1:9.

Se lavaron las secciones con TBS, 3 veces, durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cobaya (Zymed) que se vende listo para usarse. Tras una hora de incubación a 4°C, se lavaron las secciones con TBS 3 veces, 10 minutos.

La incubación con el complejo avidina-biotina-fosfatasa alcalina (ABC-AP, Dako) se realizó en TBS pH 7.6, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las secciones, otra vez, 3 veces, 10 minutos.

El revelado de la actividad fosfatasa alcalina se realizó mediante la incubación de las secciones en sustrato para fosfatasa alcalina (AP-red, Zymed), preparado según las indicaciones del fabricante, durante 30 minutos. Se lavaron las secciones con TBS pH 7.6, 2 veces, durante 5 minutos y, posteriormente, se realizó un lavado con agua Milli-Q. El montaje de las preparaciones se realizó en medio acuoso.

## 8.-VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

Según el medio en el que se lisen los tejidos, el método de detección, aún siendo un Lowry para todos los casos, varía. Así, si se trata de muestras disueltas en un tampón que contenga detergentes y agentes reductores (como es el caso de las muestras en las que se midió actividad enzimática o para Western Blotting) se usa un kit de Bio-Rad para eliminar estos agentes: *RC-DC Protein Assay* (Ref. 500-0122). Si por el contrario, no existen estos agentes en la muestra, sino que se han tratado con sulfosalicílico al 35% (como es el caso de las muestras en las que se midieron aminoácidos) se usa un método casero basado en la misma técnica.



## A.- MUESTRAS PARA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA O WESTERN BLOTTING

Se modificaron las recomendaciones del fabricante para ajustarlo a las cantidades necesarias para llevarlo a cabo en microplaca de 96 pocillos.

Se prepara un patrón de albúmina que varíe desde 0.2 mg/ml hasta 1.5 mg/ml. Y por otro lado, se diluyen las muestras según su naturaleza (islotes 1/6; cerebelo 1/100; hígado 1/100). Se muestrean 5 µl de cada, se añaden 25 µl del reactivo RCI del kit de Bio-Rad, se agita y se deja reposar un minuto a temperatura ambiente. Luego se añaden 25 µl del reactivo RCII del kit, se agita y se centrifuga la placa a 5000 g durante 15 minutos. Se elimina el sobrenadante con los agentes reductores, se deja secar y se añaden 25 µl del reactivo A', se agita y se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente para que el precipitado se disuelva. Se vuelve a agitar la placa y se añaden 200 µl del reactivo B, agitando inmediatamente. Se deja incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se lee la absorbancia a 750 nm, antes de que haya transcurrido 1 hora, en el lector de microplacas Varioskan de Thermo Electron Corporation. Tras medir, se confecciona una recta patrón de BSA y se interpolan en ella las muestras.

## B.- MUESTRAS PARA MEDIDA DE AMINOÁCIDOS

La técnica consta de dos pasos, separados por una incubación a 4°C durante 24 horas. Igual que en el caso anterior, se prepara un patrón de albúmina que varíe desde 0.2 mg/ml hasta 1.5 mg/ml. Las muestras no hay que diluirlas en este caso. Se pipetea 15 µl de la muestra o del patrón en la microplaca. Se añaden 300 µl de TCA 25% (p/v) para precipitar las proteínas. Se mantiene a 4°C durante 15 minutos y se centrifuga 15 minutos a 5000 g a 4°C. Se retira el sobrenadante para eliminar el sulfosalicílico. Se deja secar totalmente y se añaden 50 µl de NaOH 0.2M y se deja 24 horas a 4°C para resuspender las muestras.

Al día siguiente, se prepararan las dos soluciones siguientes:

<b>MEZCLA A</b>	<b>MEZCLA B</b>
-----------------	-----------------

49 vols de NaOH 0.2 M	1 vol agua
49 vols Carbonato sódico (NaCO <sub>3</sub> ) 4%	1 vol reactivo de Folin (4°C)
1 vol Tartrato Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> 2%	
1 vol sulfato cobre (CuSO <sub>4</sub> ) 1%	

Y se sigue el siguiente protocolo:

1. Por cada 50 µl de muestra, se añaden 200 µl de reactivo A
2. Mantener 10 minutos a t<sup>a</sup> ambiente
3. Añadir 25 µl de reactivo B a cada uno
4. Agitar rápidamente
5. Esperar 30 minutos

Después, se mide a 750 nm en el lector de microplacas Varioskan de Thermo Electron Corporation. Se confecciona la recta patrón de BSA y se interpolan en ella las muestras.

## 9.- RT-PCR A TIEMPO REAL

### A.- EXTRACCIÓN DEL RNA

Según el tejido del que se parta, es necesario usar unas condiciones específicas. En el caso de trabajar con islotes o con hígado, que son tejidos con un bajo contenido lipídico, no son necesarias unas condiciones especiales, por lo que se utiliza el kit de extracción de Qiagen para pequeñas cantidades de tejido, RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Ref. 74104). Este kit elimina la extracción con fenol:cloroformo, basandose en la capacidad de unir RNA que poseen unas membranas de silica-gel. Bajo unas determinadas condiciones de hidrofobicidad, combinadas con velocidad que aporta la centrifugación, se asegura la unión RNA-membrana.

Sin embargo, como el cerebelo es un tejido rico en lípidos es necesario introducir una modificación al método anterior. Es necesario añadir el paso de extracción con fenol:cloroformo al procedimiento.

En los dos casos, se siguen las indicaciones del fabricante, lisando los tejidos en buffer RT (islotes e hígado) o en QIAzol (Ref. 50979306. Qiagen) (cerebelo). Tras añadir etanol, se centrifuga, quedando así el RNA unido a la membrana. Se lava para eliminar restos de sales y se eliminan todos los restos de etanol que pudiesen quedar, para poder finalmente eluir el RNA en 30 µl de agua libre de RNAsas.

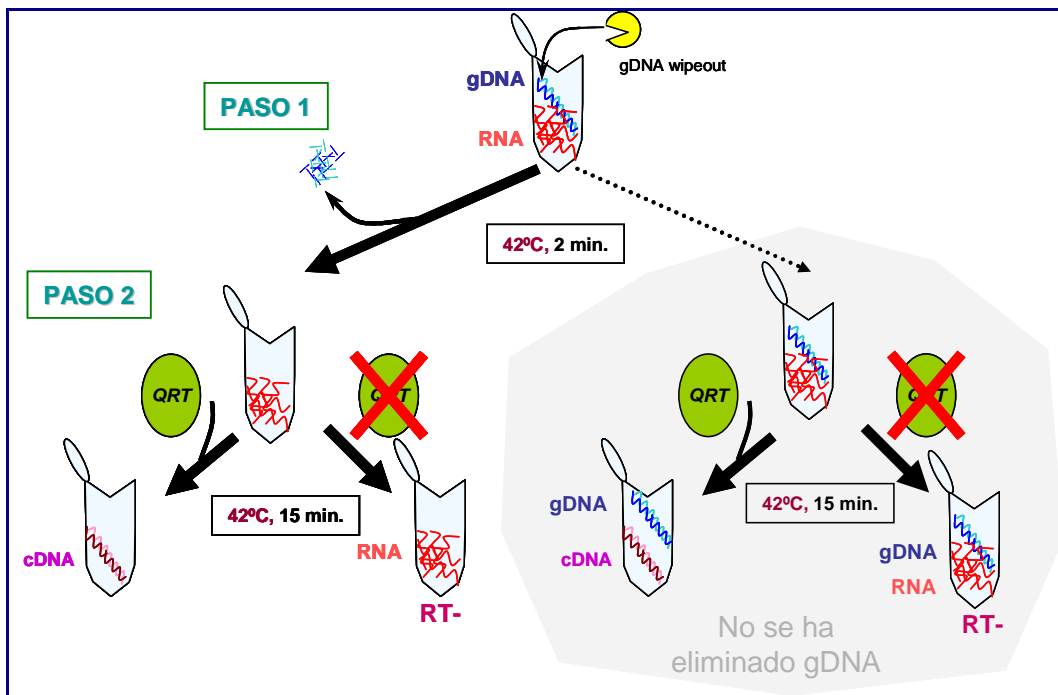
## B.- RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA

Primero es necesario valorar la cantidad de RNA que se ha eluído en el paso anterior. Para ello se diluyen 2 µl del RNA recién extraído en 50 µl de agua Milli Q autoclavada (ya que el agua tratada con DEPC puede causar interferencias en la medida) y se miden en cubetas UVette® (Ref. 952 01 005-1. Eppendorf), que son especiales para pequeños volúmenes y libres de RNA, DNA y proteínas. Se usa un espectrofotómetro de Eppendorf (Eppendorf BioPhotometer).

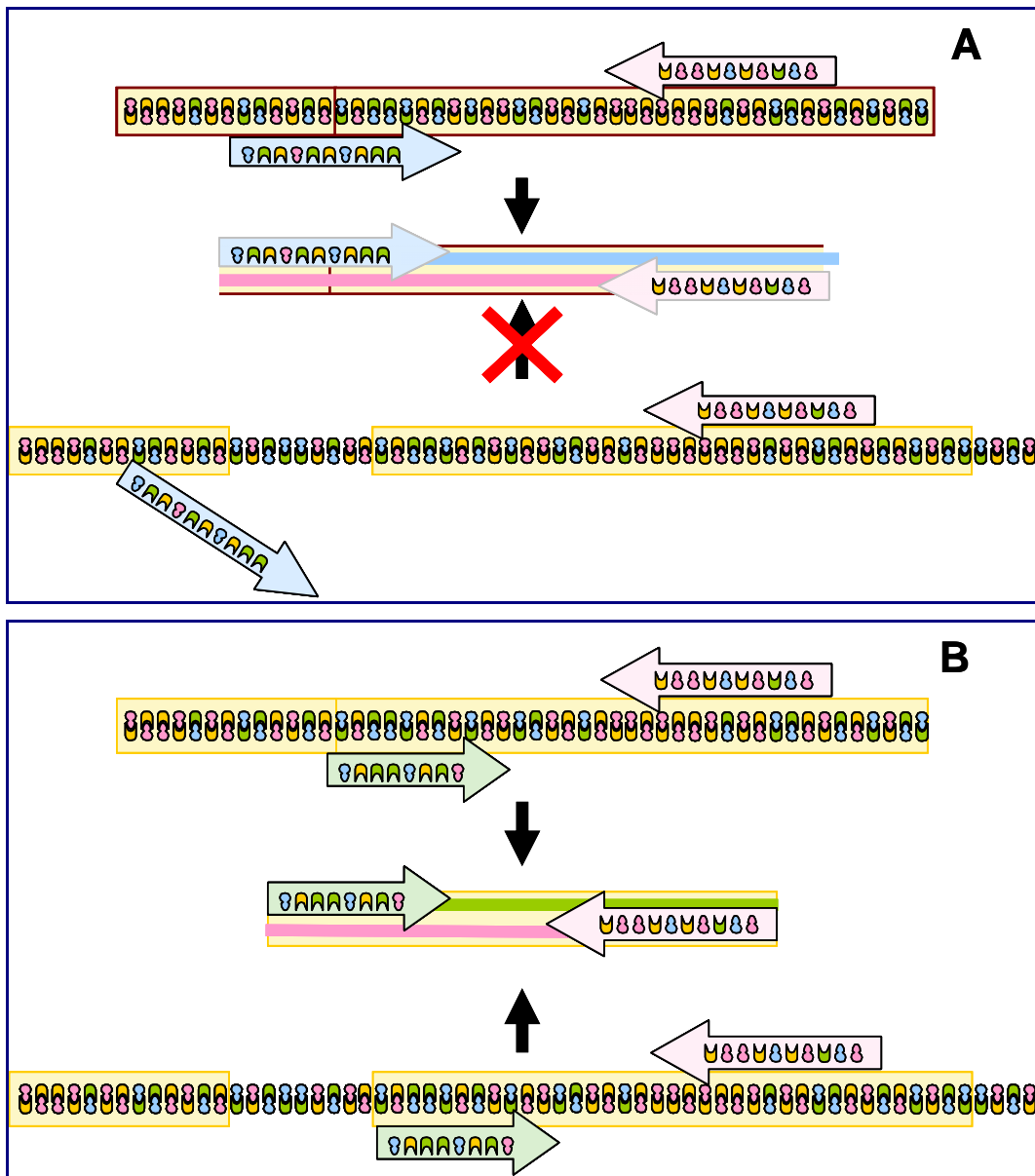
Se valora la concentración de RNA a través del valor de absorbancia a 260 nm, pero también su pureza, su contenido en proteínas, a través del valor  $A_{260}/A_{280}$ .

Para retrotranscribir el RNA se usa un kit de QIAGEN Quantitec Reverse Transcription (Ref. 509205311). Debido a la gran afinidad de la enzima *Quantiscript Reverse Transcriptase* por el RNA, no debe sobrepasarse la cantidad inicial de 1 µg de RNA (incluyendo cualquier rRNA o mRNA). El kit permite, en un primer paso de 2 minutos a 42°C, la eliminación del DNA genómico que no se ha eliminado en la extracción, gracias a la acción de la *gDNA wipeout*. Posteriormente se lleva a cabo la retrotranscripción del RNA en cDNA. Este segundo paso, que se realiza a 42°C durante 15 minutos, tendrá lugar en presencia de la *Quantiscript Reverse Transcriptase* y de una mezcla de primers aleatorios y de dNTPs (figura 21). En este mismo momento, y gracias a la actividad RNasa H de la transcriptasa del kit, se degrada el RNA que, tras ser retrotranscrito, se encuentra hibridado con el cDNA, pero no el RNA aún libre. De esta manera, se elimina cada molécula de RNA ya retrotranscrita, liberando también las nuevas moléculas de cDNA. Tras la necesaria inactivación de la enzima *Quantiscript Reverse Transcriptase* a 95°C (3 minutos) el producto final se puede almacenar a -20°C o usar directamente en la RT-PCR, ya que es totalmente compatible con los productos de Applied Biosystems usados posteriormente.

A la vez que se retrotranscriben las muestras, es necesario preparar un control negativo para la PCR. Se trata de comprobar que realmente se ha eliminado el DNA genómico en el primer paso del proceso. Para ello, tras someter al paso de 2 minutos a 42°C en presencia de la DNasa, se separa una pequeña alícuota que será procesada como el resto de la muestra, pero en el segundo paso (15 minutos a 42°C) no se añadirá la *Quantiscript Reverse Transcriptase* a la mezcla de reacción. Este es el control que se denomina **RT-**. Cuando este control se someta a la amplificación por PCR, no deberá amplificar nada si el DNA genómico se ha eliminado correctamente, porque los primers de la PCR tan sólo son capaces de unirse a fragmentos de DNA, no de RNA. Al carecer el control RT- de retrotranscriptasa, no se ha podido convertir el RNA en cDNA, por lo tanto, no unirá los primers. Sin embargo, si la eliminación de DNA genómico ha fallado, en el control RT-, además de RNA no retrotranscrito, también habrá DNA genómico, donde sí podrían unirse los primers y falsear los resultados (figura 21)



**Figura 21: Representación del proceso de eliminación de DNA genómico (gDNA) y de la posterior retrotranscripción.** Se representa también la elaboración de los controles negativos RT-, que se usan para descartar la posibilidad de que no se haya eliminado el gDNA. Se representan las dos opciones, tanto que se elimine correctamente el gDNA, como que no (zona sombreada). QRT: *Quantiscript Reverse Transcriptase*.



**Figura 22: Representación de los dos tipos amplicones posibles según la división génica en intrones y exones.** Los exones se representan sombreados en amarillo. Se ha representado el cDNA (producto de la retrotranscripción del RNA) en la parte superior de cada gráfico y el DNA genómico (gDNA) en la parte inferior. El producto amplificado en la PCR se ha representado entre los dos anteriores. **A:** El amplicón se diseña en la unión exón-exón, por lo que no puede amplificarse el DNA genómico, tan sólo en cDNA. **B:** El amplicón se diseña dentro de un exón, por lo que se puede amplificar tanto el gDNA como el cDNA.

Otro mecanismo de control que existe para eliminar los problemas de la posible contaminación por DNA genómico, es el diseño de amplicones (fragmento de DNA que

va a ser amplificado. Comprende la sección entre los dos primers). Si el amplicón se diseña entre la unión exón-exón, es decir, en una región exclusiva del RNA (ya que en el DNA genómico las uniones entre exones se realizan a través de otras secuencias llamadas intrones: exón-intrón-exón), esto supone una garantía de que los resultados no están sobre-estimados. Sin embargo, si no disponemos de toda la información sobre el gen que queremos estudiar o si no es posible el diseño en esa región concreta, los amplicones se diseñan dentro de uno de los exones del RNA en cuestión, por lo que no nos asegura la exclusiva amplificación del RNA, ya que los primers diseñados también serían compatibles con la misma región del DNA genómico (figura 22).

### C.- PCR A TIEMPO REAL

La PCR a tiempo real que hemos desarrollado se basa en la capacidad que tienen las sondas TaqMan-MGB para unirse a un pequeño fragmento de DNA recién amplificado a partir de la unión de unos primers específicos. La sonda TaqMan, además de tener una secuencia 100% homóloga con el DNA que se desea amplificar, tiene otras 4 peculiaridades:

- ▶ En su extremo 5': tiene unida un fluoróforo, un *reporter*.
- ▶ En su extremo 3', tiene:
  - fragmento MGB (*Minor Groove Binder*): grupo químico que se une al surco menor del DNA, lo que hace que la sonda sea más eficiente, ya que aumenta la temperatura de *melting*, utilizando un fragmento de DNA más corto.
  - NFQ (*Non Fluorescent Quencher*): una molécula química que elimina la emisión basal de fluorescencia del *reporter*.
  - El extremo 3' está fosforilado, de manera que la enzima polimerasa no es capaz de pegarse a la sonda para iniciar la polimerización de un nuevo fragmento. De esta manera, la polimerasa sólo se unirá al extremo 3' del primer, desde donde comenzará a polimerizar una nueva hebra.

Durante la polimerización de las nuevas hebras, el primer específico se une a la hebra molde, al igual que la sonda específica. En estas condiciones, el *reporter* de la sonda no puede emitir fluorescencia porque el *quencher* (NFQ) está impidiéndolo. La

polimerasa empieza a polimerizar la nueva hebra desde el extremo 3' del primer hacia la sonda. Cuando la enzima reconoce la estructura en horquilla que caracteriza al extremo 5' de la sonda, es capaz, mediante su actividad 5' nucleasa, de romper la sonda a la vez que sigue polimerizando la nueva hebra. Esto hace que el *reporter* y el *quencher* se separen, de manera que el *reporter* ya es capaz de emitir fluorescencia. Cuando la señal fluorescente es suficiente como para superar el umbral de detección del aparato, se registra un ascenso de la señal, que posteriormente, tras establecer el umbral y la línea base, nos aportará un valor de Ct (*Cycle Threshold*, número de ciclos en el umbral) para el gen ensayado. Por lo tanto, se puede establecer la relación: una nueva hebra sintetizada → una sonda hidrolizada → una molécula que emite fluorescencia.

En nuestros experimentos, la PCR a tiempo real se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl y por duplicado para cada muestra. Se emplearon los TaqMan® Gene Expression Assays (20X) de Applied Biosystems para los genes: succínico deshidrogenasa (Rn0059045\_m1), GABA transaminasa (Rn00578656\_m1), α-cetoglutarato deshidrogenasa (subunidad E2) (Rn02345836\_m1), semialdehído succínico reductasa (AKR7A2) (Rn00592995\_m1) y 18S (Hs99999901\_s1) como gen control, ya que es el que menos varía entre los tres tejidos en los que se llevó a cabo la RT-PCR. Para el gen de la semialdehído succínico deshidrogenasa se realizó un Custom Gene Expression Assay (20X) con el extremo 3' de la secuencia génica (L34821). Applied Biosystems, a través de este producto, ofrece el servicio de diseño del amplicón, y puesta a punto del ensayo, de manera que no es preciso ni comprobar la linealidad respecto al gen control, ni hallar las concentraciones óptimas para los primers y la sonda.

Para preparar las muestras, se usó agua Milli Q autoclavada y la *master mix* que suministra Roche Applied Science: FastStart TaqMan® Probe Master (Rox), suplementada con Rox, también de Roche Applied Science (8,7 µl de Rox 100 mM por cada vial de 1.25 ml de Master Mix 2X).

Tras ensayar varias diluciones para los tres tejidos (islotes, cerebelo e hígado), se establecieron como diluciones viables las de 1/10 y 1/100. Lógicamente, se usó 1/100, ya que así pudimos aprovechar mucho mejor las muestras. De igual manera, los controles RT-, también se diluyeron 1/100. Las diluciones se llevaron a cabo con agua Milli Q autoclavada.

Cada muestra se ensayó por duplicado, pero no se preparó por duplicado. Es decir, de cada muestra, se prepararon dos ensayos en el mismo tubo. De este mismo tubo se muestrearon dos pocillos de la placa para PCR. En cada pocillo, donde el volumen final de reacción es 20 µl, las cantidades de cada componente del ensayo son:

- ▶ 10 µl de la Master Mix 2X
- ▶ 1 µl de agua Milli Q
- ▶ 4 µl de la muestra previamente diluida (dilución 1/100)
- ▶ 5 µl de agua Milli Q, para completar el volumen final de reacción.

Por lo tanto, en cada tubo se añadió el doble de las cantidades indicadas arriba. Una vez mezclados todos los componentes de la reacción, se pipetearon 19.5 µl en cada pocillo de la placa de PCR.

Además de las muestras y de los controles RT- de cada una de las muestras para cada uno de los genes ensayados, también es necesario realizar otro control llamado NTC. Consiste en llevar a cabo una PCR con todos los componentes que se añaden a la mezcla de reacción, salvo la muestra. Es decir, sin añadir un molde de DNA, de manera que si aparece un aumento de la fluorescencia, es debido a una contaminación de la Master Mix, del agua o de los primers/sonda. Por lo tanto, tan sólo se llevará a cabo un control NTC por cada gen ensayado. Y habrá que realizarlo en cada placa que se someta a la RT-PCR.

El ciclo de la RT-PCR que se usó fue:

- PASO 1: 2 minutos a 50°C (Activa la Amperasa UNG)
- PASO 2: 10 minutos a 95°C
- PASO 3: 40 ciclos:
  - 15 segundos a 95°C → Desnaturalización
  - 1 minuto a 60°C → *Annealing* y extensión. En este mismo paso se recogen los datos de fluorescencia emitidos por los fluoróforos de las sondas en cada uno de los ciclos.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador de Applied Biosystems: 7300 Sequence Detection System, que también analiza los resultados. Tanto el umbral como la línea base se establecieron automáticamente para cada gen.



Una vez obtenidos los Ct (ciclo inmediatamente posterior al umbral), se analizan por el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen control}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tejido x} - \Delta Ct \text{ tejido control}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  → Indica la expresión de un gen en un tejido respecto a la expresión de ese mismo gen en otro tejido distinto.

Para el análisis estadístico se ha realizado una modificación en el orden de las operaciones, ya que se han comparado estadísticamente, a través del programa estadístico SPSS (versión 11.0), los valores medios de  $2^{-\Delta Ct}$  de cada tejido, para posteriormente transformarlos en el valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  correspondiente.

De cualquier manera, el valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  indica el número de veces que un gen se expresa en un tejido respecto a la expresión de ese mismo gen en otro tejido diferente. Se puede expresar también como un porcentaje, y su significado es el mismo.

## 10.- MEDIDA DEL METABOLISMO

Se valoró tanto el metabolismo de la glucosa, a partir de D-[U- $^{14}C$ ]-glucosa, como el metabolismo de la glutamina, a partir de D-[U- $^{14}C$ ]-glutamina. Ambos compuestos radiactivos fueron adquiridos en Amersham Bioscience S.L.

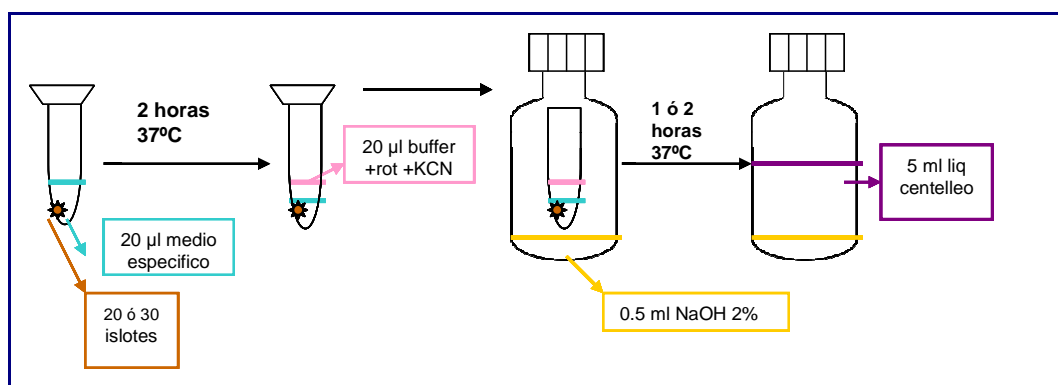
### A.- METABOLISMO DE GLUCOSA

Se usaron dos concentraciones diferentes de glucosa: 3 mM y 20 mM, con una actividad específica de 2.5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  y 16.6  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ , respectivamente. Se valoró la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  producido por 20 islotes en presencia de dos compuestos: alilglicina 10 mM, que es el precursor de un inhibidor del  $\text{GAD}_{65/67}$  y gabaculina 250  $\mu\text{M}$ , que es un inhibidor de la GABA transaminasa. Por lo tanto, ambos interfieren en el metabolismo del GABA, el primero inhibiendo su producción, y el segundo inhibiendo su degradación.

El método se basa en que una vez metabolizada la glucosa, se libera  $^{14}\text{CO}_2$ , que sale del eppendorf en el que se está llevando a cabo la reacción y entra en contacto con la sosa (NaOH) que hay alrededor del tubo, convirtiéndose, en este medio básico, en

$\text{HNa}^{14}\text{CO}_3$ . Y es este  $\text{HNa}^{14}\text{CO}_3$  el que finalmente se valorará en un contador beta (WinSpectral 1414 liquid Scintillation Counter; Perkin Elmer)

Se incubaron 3 grupos de 20 islotes, por cada rata y condición experimental, en 20  $\mu\text{l}$  del medio de incubación correspondiente (glucosa, a una de las dos concentraciones, disuelta en Krebs Ringer bicarbonato junto con alilglicina o gabaculina) durante dos horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se les añadieron 20  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0.4M, pH 6.0, con rotenona 10  $\mu\text{M}$  y KCN 1.5 mM. Posteriormente, se introducen los eppendorf abiertos en viales de centelleo que contienen 0.5 ml de NaOH 2%, se cierran herméticamente y se incuban otras 2 horas a 37°C. Finalmente, se retira el eppendorf y se añaden 5 ml de líquido de centelleo (Pico-Fluor 40 de Perkin Elmer. Ref: 6013349) (figura 23). Se mide la radiactividad de los viales en el contador beta.



**Figura 23: Esquema de la metodología usada en la medida de la actividad metabólica a partir de un compuesto radiactivo (D-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glucosa o D-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina).** Se representan los islotes dentro de los tubos eppendorf, y estos, dentro de viales de centelleo. También se indican los periodos de incubación a 37°C. (rot: rotenona 10  $\mu\text{M}$ , KCN: KCN 1.5 mM).

## B.-METABOLISMO DE GLUTAMINA

Análogamente al caso del metabolismo de la glucosa, se usaron dos concentraciones diferentes de glutamina: 0.5 mM y 10 mM, con una actividad específica de 4.54  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  y 1.25  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ , respectivamente. Se valoró la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  producido por 30 islotes en presencia de varios cetoácidos (KIC 10 mM, KIV 10 mM, KMV 10 mM, KC 10 mM) y otros compuestos como alilglicina 10 mM, gabaculina 250  $\mu\text{M}$ , SAD 10 mM, que es el precursor del ácido succínico (ciclo de Krebs), mercaptopropiónico 3 mM, que es otro inhibidor del  $\text{GAD}_{65/67}$  o glucosa 20 mM.

## 11.- VALORACIÓN DE DNA

Para valorar el contenido de DNA de los islotes pancreáticos se hacen grupos de 20 islotes. Es necesario lavarlos dos veces con PBS para eliminar cualquier resto de glucosa, ya que interfiere con el método de medida.

Se sonicán los islotes en 100 µl de agua Milli Q: 4 ciclos de 10 pulsos cada uno, con la intensidad mínima y con un 10% de frecuencia. Posteriormente se pipetea en una placa de 96 pocillos especial para medidas fluorimétricas (Costar®, Corning Incorporated). Se muestrea tres veces con los siguientes volúmenes: 20, 20 y 40 µl. Se evapora a 37 °C durante toda la noche.

De igual manera, se preparan en agua Milli Q varias concentraciones conocidas de DNA bovino (ref. D-4522, Sigma) que van desde 0.01 µg DNA/20 µl hasta 0.64 µg DNA/20 µl. También se dejan evaporar a 37 °C.

En el momento que se vaya a realizar la medida, se reconstituyen todas las muestras con 20 µl de NaOH 5mM. Posteriormente se añaden 20 µl de PCA 1M y se incuban, tapado, a 70°C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se para la reacción en hielo y se añaden 40 µl de la mezcla fluorescente que se ha preparado en la anterior hora de incubación de la manera que sigue:

En primer lugar es necesario purificar DABA (ácido diaminobenzóico) (ref. 11383-2, Aldrich), para lo cual, se disuelven 200 mg por cada mililitro de agua Milli Q, se añaden 10 mg de charcoal y se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos. Se recoge el sobrenadante y se vuelve a purificar con 10 mg de charcoal otras 2 veces más. Finalmente, la solución de DABA tres veces purificada, se filtra con un filtro de 22 µm de diámetro de poro. Para preparar la mezcla fluorescente que necesitamos, se añaden 3 volúmenes de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 mM (preparado en NaOH 1 M) por cada volumen de DABA purificado.

Tras añadir la mezcla fluorescente, se introduce la placa en el lector de microplacas (Varioskan, Thermo Electron Corporation) donde se agita la placa y se

incuba 1 hora a 37°C, para que el DABA, producto fluorescente, se una al DNA. Posteriormente, se diluye la muestra con 250 µl de HCl 1 M y se procede a leer la emisión fluorescente de las muestras excitando el DABA con una longitud de onda de 408 nm y registrando la emisión a 520 nm. Es importante que el registro de la fluorescencia sea a 37 °C, ya que se ha comprobado que la reacción es mucho más eficiente a esta temperatura que a 20 °C.

## 12.- ELECTROFISIOLOGÍA

Las pipetas que se usaron para sostener los trozos de membrana (*patch*) fueron obtenidas a partir de cristal de borosilicato, de manera que, en la punta, la resistencia fuese de 3-6 MΩ.

Las medidas se llevaron a cabo con un amplificador de *patch-clamp* EPC9, con el software Pulse (versión 8.53) (HEKA Electronics, Lambrecht, Alemania).

Las células β fueron identificadas por su tamaño, por las propiedades de inactivación de la corriente de Na<sup>+</sup> regulada por voltaje (107) y por el potencial de membrana de depolarización en presencia de glucosa 10 mM en el medio extracelular.

Para conseguir la configuración de la célula completa perforada (*perforated patch whole-cell*), se añadió el antibiótico formador de poros (amfotericina B, 0.24 mg/ml) en la solución de la pipeta.

### Medida del potencial de membrana y de la conductancia en la célula completa

Ambos fueron medidos en las mismas células alternando los dos métodos de medida usados ("*clampado*" de la corriente - *current-clamp* - o del voltaje - *voltage-clamp*). La conductancia se valoró indirectamente, ya que se registró la corriente de las células en respuesta a pulsos que variaron desde -10 mV hasta -70 mV. Las medidas del potencial de membrana fueron directas, ya que lo que se registró fue la diferencia de potencial real entre dos electrodos. Uno colocado en el interior celular y otro en el exterior. Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

**SOLUCIÓN EXTRACELULAR:** NaCl 138 mM, KCl 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.6 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, HEPES 5 mM y glucosa 10 mM. (pH 7.4, ajustado con NaOH)

**SOLUCIÓN DEL INTERIOR DE LA PIPETA:** K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 76 mM, KCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y HEPES 5 mM. (pH 7.35, ajustado con KOH).

#### Medida de la capacitancia celular en *patches* de membrana

Para registrar la actividad de un único canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> se prepararon trozos de membrana (*patches*) en la configuración *inside-out*, y se mantuvieron a 0 mV. En este caso, las soluciones empleadas fueron:

**SOLUCIÓN DEL BAÑO EXTERIOR:** KCl 107 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 10 mM y HEPES 10 mM (pH 7.15, ajustado con KOH)

**SOLUCIÓN DEL INTERIOR DE LA PIPETA:** NaCl 138 mM, KCl 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.6 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM y HEPES 5 mM (pH 7.4, ajustado con NaOH)

#### Medida del potencial de membrana y de la conductancia en *patches* de membrana

La exocitosis se detectó como los cambios en la capacitancia celular, que fueron estimados según la técnica de Lindau-Neher, que fue mejorada con la función “Sine + dc” del software Pulse. Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

**SOLUCIÓN DEL BAÑO EXTERIOR:** Trietilamina (TEA) 10 mM, NaCl 128 mM, KCl 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.6 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, HEPES 5 mM y glucosa 10 mM. (pH 7.4, ajustado con NaOH)

**SOLUCIÓN DEL INTERIOR DE LA PIPETA:** Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 76 mM, KCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y HEPES 5 mM. (pH 7.35, ajustado con KOH)

### 13.- VALORACIÓN DE GHB (ÁCIDO $\gamma$ -HIDROXIBUTÍRICO)

El método desarrollado es una adaptación de otras técnicas empleadas para detectar ínfimas cantidades de ácidos grasos polinsaturados (108), de cadena larga (109, 110), en suero humano. Estas técnicas combinan separación por HPLC y detección por emisión fluorescente de un compuesto con el que se han derivatizado los ácidos grasos de las muestras de estudio. El límite de detección varía desde 0.5 hasta 5 femtomoles en 10  $\mu$ l inyectados, es decir, desde 0.05 hasta 0.5 nM.

El protocolo descrito se basa en el método de detección por absorbancia del lactato (111, 112), pero en este caso, se introduce un compuesto fluorescente para derivatizar el  $\gamma$ -hidroxibutírico (GHB) o ácido 4-hidroxibutanoico, que también puede derivatizar cualquiera de sus isómeros posicionales:  $\alpha$ -hidroxibutírico y  $\beta$ -hidroxibutírico ( $C_4H_8O_3$ ), además de cualquier compuesto con un grupo -COOH. Este compuesto es el BrMMC (4-bromometil-7-metoxi-coumarina) (ref. 17623, BioChemika), que ha sido ya usado con anterioridad para valorar ácidos grasos en eritrocitos (113).

El BrMMC es un compuesto fluorescente cuyas longitudes de onda de excitación y de emisión son, respectivamente, 325 nm y 398 nm. El BrMMC forma un enlace tipo ester con los grupos carboxilo de compuestos aromáticos, heterocíclicos o alifáticos, emitiendo suficiente fluorescencia como para detectar pmoles (114).

### Preparación de las muestras

La muestra que se quiere detectar, ya sea una muestra biológica o el estándar de GHB,  $\alpha$ -OH-B,  $\beta$ -OH-B o lactato, se debe preparar en un volumen máximo de 25  $\mu$ l. Así, se incuban los islotes pancreáticos aislados, durante 2 horas a 37°C, en 25  $\mu$ l del medio de incubación: Krebs-Ringer bicarbonato suplementado con semialdehído succínico (SSA) 0.5 mM y con  $\alpha$ -cetobutírico (KB) 5 mM. El blanco se prepara incubando también el mismo medio, pero en ausencia de islotes. Y los estándares se preparan, a la concentración necesaria, en el mismo medio, y se incuban, igualmente, dos horas a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, todas las muestras se procesan igual. Se precipitan las proteínas del medio mediante una incubación con PCA y Tris/ $KHCO_3$  para, posteriormente, ser derivatizadas. Para ello se sigue el siguiente protocolo:

1. A los 25 µl del medio con los islotes, para la muestra de estudio, o a los 25 µl del blanco o los estándares, se les añaden 20 µl de PCA 1.35 M (1.00518, Merck). Se deja incubar durante 5 minutos a 4°C.
2. Se añaden 15 µl de Tris 0.1M/KHCO<sub>3</sub> 2.8 M y se deja reposar 2-3 minutos.
3. Se centrifuga durante 5 minutos en una microfuga a 13000 rpm.
4. Se retiran 50 µl del sobrenadante y se introducen en un vial de 3.5 cm (60910L-12, Opticlear®).
5. Se añaden 10 µl de NaOH 200 mM.
6. Se deseca en el Speed-Vac durante 45 minutos.
7. Se añaden 200 µl de la solución derivatizante (BrMMC 70 µM y 18-Crown-6 10 µM, en acetonitrilo (ref: 1.00030, Merck)). Como el BrMMC es un compuesto fluorescente, es sensible a la luz, por lo que tanto la solución derivatizante, como, a partir de este punto, las muestras a derivatizar, deben prepararse y procesarse en viales de vidrio protegidos de la luz.
8. Se mantiene 20 minutos en agitación a temperatura ambiente.
9. Se incuba, durante 15 minutos, en un baño a 60°C.
10. Se reserva en hielo, o a 4°C, hasta el momento de ser inyectados en el HPLC.

### Análisis de las muestras

El sistema HPLC está compuesto por:

- Un inyector Waters U6K
- Una precolumna analítica SecurityGuard C18(2) de 4.0x3.0 mm (AJO-4287, Phenomenex®), en un soporte universal SecurityGuard (ref: KJO-4282, Phenomenex®).
- Una columna Luna 3µm C18(2) de 75x4.6 mm y 3 µm de tamaño de partícula (ref: OOC-4251-E0, Phenomenex®)
- Un controlador Waters 600E
- Un detector de fluorescencia Waters 474, con una célula de flujo de 16 µl (Flor cell assembly, 16 µl. Ref: 47436. Jasco Analytical). el programa para analizar los resultados fueron analizados con el programa Clarity Lite (version 2.4.1.93) de ©DATA Apex.

Se inyectaron 20 µl de las muestras, previamente derivatizadas, en la columna, a un flujo de 1 ml/min, a temperatura ambiente. El gradiente usado para eluir las muestras fue el siguiente:

- **15 minutos:** gradiente lineal 10% → 50% de acetonitrilo (en agua Milli-Q)
- **7 minutos:** 90% de acetonitrilo en agua Milli Q, para eluir todo lo que haya podido quedar retenido en la columna.
- **5 minutos:** 10% de acetonitrilo en agua Milli Q, para restablecer las condiciones iniciales

El eluido se sometió a una detección fluorométrica usando una longitud de onda de emisión de 325 nm y una longitud de onda de emisión de 398 nm (ganancia: 1000, atenuación: 8).





## RESULTADOS

---



## **A.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LOS ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL GABA**

Aunque el tejido de estudio de esta tesis son los islotes pancreáticos, hemos comparado, tanto la actividad enzimática como la expresión génica de los enzimas estudiados entre tres tejidos bien distintos. Por un lado, hemos explorado un tejido típicamente GABAérgico, como es el cerebelo. En él se genera y se metaboliza GABA, por lo que se espera que, la maquinaria enzimática con la que está relacionado, esté muy desarrollada. Por otro lado, hemos elegido el tejido hepático como un referente de un tejido típicamente metabólico. El hígado es un órgano destinado al almacenamiento de energía, en el que no esperamos encontrar la maquinaria que contribuye a la elaboración de GABA, aunque sí la maquinaria para degradarlo oxidativamente. Y por supuesto, finalmente hemos analizado la maquinaria enzimática del GABA en el tejido objeto de este estudio, los islotes pancreáticos.

Hemos abordado el estudio de los enzimas que están involucrados en el metabolismo del GABA desde dos perspectivas distintas, pero complementarias. Por un lado hemos estudiado la actividad enzimática en extractos de cada uno de los tres tejidos, que en presencia de los sustratos específicos, nos aportará información sobre la actividad específica de estos enzimas. Hemos expuesto estos extractos a diferentes sustancias secretagogas y no secretagogas, con el fin de caracterizar su efecto directo sobre los enzimas estudiados. Por otro lado, hemos analizado la expresión génica, específica de tejido, de varios enzimas y la hemos comparado con los datos de actividad.

### **A1.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

#### **1.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE DOS ENZIMAS DEL *SHUNT DEL GABA*: SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO REDUCTASA Y SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO DESHIDROGENASA.**

Debido a que estos enzimas no se habían estudiado con anterioridad, ha sido necesario poner a punto tanto el método de extracción, como el ensayo de su actividad enzimática.

En un primer momento se estudiaron ambas actividades enzimáticas a través del registro de la variación de absorbancia del NADH, en el caso de la SSA deshidrogenasa (SSA-dh), o del NADPH, en el caso de la SSA reductasa (SSA-R). Debido a la limitada

cantidad de tejido que proporcionan los islotes y al trabajoso procedimiento para su aislamiento, en una primera aproximación, se usó un tejido en el que abunda el GABA y que resulta fácil de aislar, como es el cerebelo de rata. El cerebelo, un tejido típicamente GABAérgico, nos sirvió para poder registrar el efecto que varios cetoácidos y aminoácidos tenían sobre estos dos enzimas, y posteriormente compararlo con el efecto que los mismos compuestos pudiesen tener en islotes. De esta manera podríamos saber si estamos hablando de la misma isoforma, o si por el contrario, existe especificidad tisular para estas enzimas.

## **1.1.- CARACTERIZACIÓN, EN RATA, DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR ABSORBANCIA**

### **1.1.1.- Valoración en cerebelo**

Se exploró el efecto que distintas sustancias pudiesen tener sobre la actividad de ambas enzimas (Tabla 1). Así se vio que, al menos en cerebelo, la SSA reductasa se ve afectada negativamente por isobutírico 5 mM en un 23%, y positivamente por gabaculina 5 mM, que incrementa su actividad un 25% y que, además, es un inhibidor de otro enzima del *shunt* del GABA, la GABA transaminasa (GABA-T) (115). El 2-hidroxibutírico 5 mM no afecta a la actividad reductasa, aunque el 3-hidroxibutírico, su isómero posicional, sí es capaz de inhibirlo en un 20%. Un aminoácido como la taurina, que se mantiene constante, pero que se encuentra en gran cantidad en el islote (alrededor de 55 mmoles/Kg de peso seco) (59), tampoco inhibe este enzima, cuando se encuentra a una concentración de 5 mM. En cuanto a los cetoácidos, el cetocaproico (KC) 5 mM inhibe la reductasa en un 50 %, y el cetobutírico (KB) en un 35%. El cetometilvalérico (KMV) 5 mM, que es un cetoácido secretagogo, inhibe en un 40% al enzima. Igualmente, el cetoisocaproico (KIC) 5 mM también reduce la actividad enzimática en un 60%, aunque su producto aminado, la leucina, tan sólo afecta a la actividad SSA-R en un 25%. Sin embargo, aunque el cetoisovalérico (KIV) reduce la actividad en un 55%, su producto aminado, la valina, a una dosis de 5 mM, no tiene ningún efecto.

El enzima SSA-dh, a diferencia de la reductasa, tan sólo se ve afectado negativamente por el KIV 5 mM (no así por la valina), por el KIC 5 mM y por la leucina 5 mM, que no inhiben esta actividad en más de un 20 %. El KB 5 mM, ejerce un efecto especialmente significativo, ya que inhibe la actividad enzimática en su totalidad (Tabla 3).

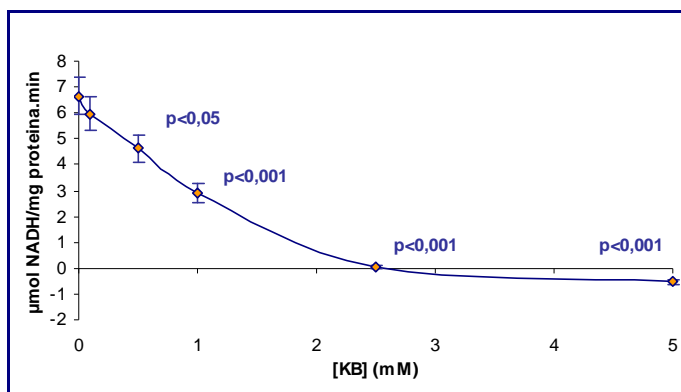
	SSA-R		SSA-dh	
control	2,54±0,14	---	15,93±0,60	---
IB 5 mM	1,95±0,20	p<0,04	16,00±0,59	ns
2-OH-BUT 5 mM	2,62±0,24	ns	18,54±0,89	ns
3-OH-BUT 5 mM	2,07±0,12	p<0,02	18,63±0,58	ns
GABACUL 5 mM	3,25±0,15	p<0,02	17,38±0,96	ns
TAU 5 mM	2,02±0,25	ns	18,14±2,74	ns
KC 5 mM	1,27±0,22	p<0,001	15,04±2,07	ns
KB 5 mM	1,67±0,19	p<0,01	0,18±0,11	p<0,0001
KMV 5 mM	1,33±0,17	p<0,001	15,65±0,70	ns
KIV 5 mM	1,09±0,12	p<0,001	12,49±1,33	p<0,02
VAL 5 mM	2,07±0,25	ns	17,64±2,60	ns
KIC 5 mM	1,06±0,13	p<0,001	12,79±1,23	p<0,03
LEU 5 mM	1,92±0,21	p<0,04	13,02±1,14	p<0,05

**Tabla 3: Actividad enzimática de los enzimas semialdehído succínico reductasa (SSA-R) ( $\mu\text{moles NADPH}/\text{minuto.mg proteína}$ ) y semialdehído succínico deshidrogenasa (SSA-dh) ( $\mu\text{moles NADH}/\text{minuto.mg proteína}$ ).** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y al coeficiente de extinción molar para el NAD(P)H ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo en 10  $\mu\text{l}$  del extracto de cerebelo (250 mg tejido fresco/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 5-7 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

Si comparamos la actividad de la semialdehído reductasa frente a la deshidrogenada, se puede observar que la actividad deshidrogenasa es 6.3 veces mayor que la actividad reductasa en cerebelo.

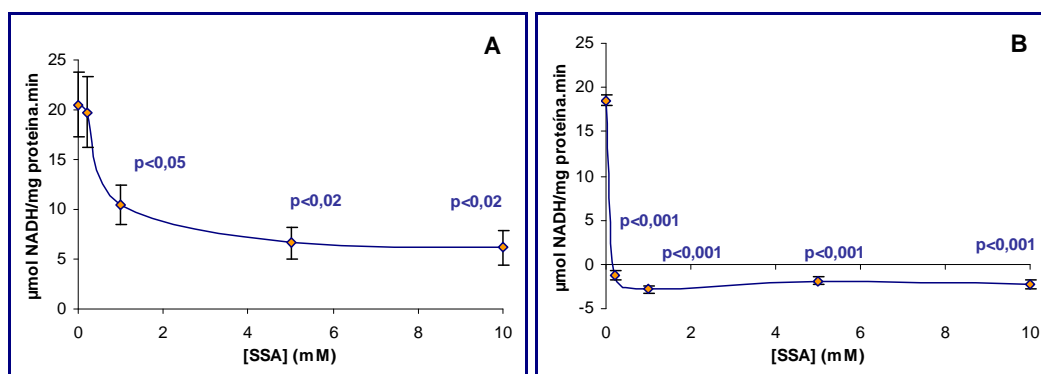
#### 1.1.1.1.- Estudio del efecto del KB 5 mM en el enzima SSA-dh.

El enzima semialdehído succínico deshidrogenada es el encargado de transferir todo el flujo metabólico que proviene del catabolismo del GABA, hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por lo tanto la inhibición total por parte del KB parece bastante determinante para el ciclo del GABA. Por eso, se desarrolló una dosis respuesta de cetobutírico, a una concentración fija de semialdehído succínico (200  $\mu\text{M}$ ) (figura 24).



**Figura 24: Dosis respuesta del enzima semialdehído succínico deshidrogenada frente a cetobutírico.** Se analiza el efecto de concentraciones crecientes de KB, desde 0.1 mM hasta 10 mM. Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y al coeficiente de extinción molar para el NADH ( $\epsilon_{340nm} = 6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo en 10  $\mu\text{l}$  del extracto de cerebelo (250 mg tejido fresco/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

La  $\text{ED}_{50}$  del cetobutírico es 0.89 mM, lo que significa que el enzima SSA-dh queda totalmente inhibido cuando se expone a una dosis de 2 mM de KB. Para descartar una posible inhibición por sustrato, también llevamos a cabo una dosis respuesta de SSA (figura 25A), que muestra que aunque sí disminuye la actividad de la deshidrogenasa al ir aumentando la concentración de SSA, no llega nunca a inhibirse totalmente. El máximo de inhibición ejercida por el sustrato se alcanza a la dosis de 5 mM, y supone una reducción del 75% de su actividad. Sin embargo, la dosis de SSA usada en los experimentos, 200  $\mu\text{M}$ , es la apropiada, ya que no ejerce ningún tipo de inhibición. Sin embargo, cuando se repite la dosis respuesta de SSA a una concentración constante de KB (2.5 mM), que resulta inhibitoria, la mínima cantidad de SSA usada (200  $\mu\text{M}$ ) supone una inhibición total de la actividad (figura 25B).



**Figura 25: Dosis respuesta de la actividad semialdehído succínico deshidrogenada frente a su propio sustrato (SSA) en ausencia (A) o en presencia de KB 2.5 mM (B).** Se analiza el efecto de concentraciones crecientes de SSA, desde 0.02 mM hasta 10 mM. Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y al coeficiente de extinción molar para el NADH ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo en 10  $\mu\text{l}$  del extracto de cerebelo (250 mg tejido fresco/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 3 (A) o 6 (B) individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

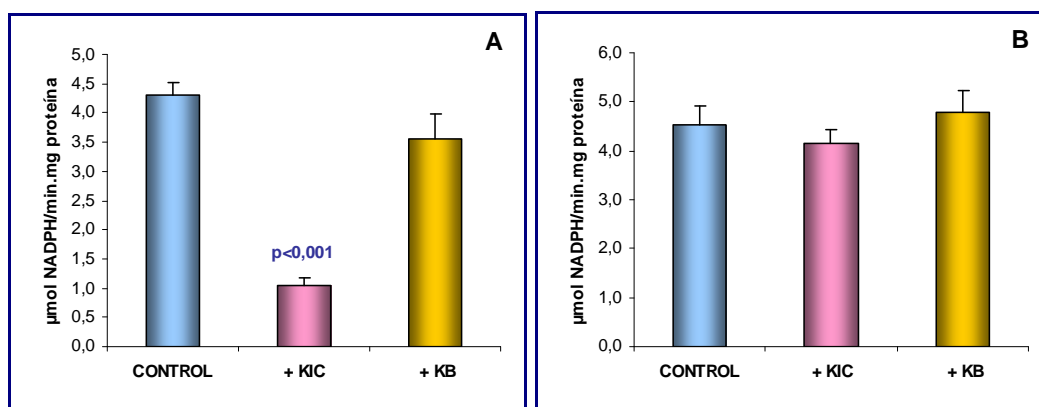
### 1.1.2.- Valoración en islotes pancreáticos

Una vez llevada a cabo la exploración en cerebelo, se decidió estudiar el efecto que ciertos cetoácidos secretagogos tenían sobre estas dos enzimas. Así, el KIC, que es un potente secretagogo, aunque el mecanismo por el que desencadena la secreción aún está por determinar (116), tiene un efecto negativo sobre la actividad reductasa, aunque no sobre la deshidrogenasa. Y mientras que el KB ejerce un efecto drástico sobre la deshidrogenasa, no es tan potente sobre la reductasa. Por lo tanto, estos dos cetoácidos fueron los que se emplearon para caracterizar la actividad de ambas enzimas.

El enzima SSA-R (figura 26A) en el islote pancreático se ve inhibido por KIC 5 mM en un 75%, lo que supone un 25% más de inhibición que la ejercida sobre el enzima cerebelar, mientras que el KB 5 mM, no tiene ningún efecto estadísticamente significativo, aunque tiende a inhibir ligeramente la actividad enzimática. Por el contrario, en el caso de la semialdehído succínico deshidrogenasa (figura 26B), ninguno de los dos cetoácidos tienen efecto sobre la actividad, lo que plantea una diferencia con el enzima deshidrogenasa cerebelar, que se caracterizaba por una fuerte inhibición por el KB 5 mM.

En el caso de los islotes, las dos actividades se encuentran en el mismo orden de magnitud. La SSA-R del islote es el doble que la del cerebelo. Y la actividad SSA-dh cerebelar es 3.5 veces mayor que la pancreática.





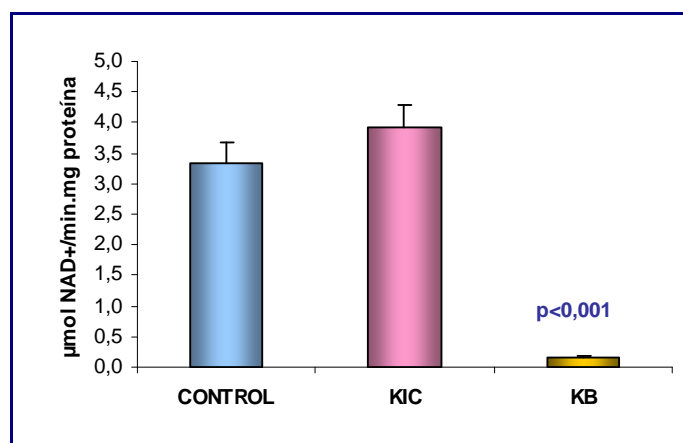
**Figura 26: Medida, por absorbancia, del efecto de KIC 5mM y KB 5 mM sobre la actividad enzimática de los enzimas SSA-R (A) y SSA-dh (B) en islotes de rata.** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y al coeficiente de extinción molar para el NAD(P)H ( $\epsilon_{340nm} = 6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo en 25  $\mu\text{l}$  del extracto de islotes ( $\sim 6$  islotes / $\mu\text{l}$ ). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

### 1.1.3.- Valoración en hígado

El hígado se usó como referencia de tejido con alta tasa metabólica y que no es típicamente GABAérgico (58).

No fue posible medir la actividad semialdehído succínico reductasa, ya que los valores de absorbancia obtenidos rozaban el límite de detección del aparato, eran incoherentes y conllevaban un error desmesurado (datos no mostrados). Sin embargo, la actividad semialdehído succínico deshidrogenada sí es mensurable con esta técnica (figura 27). El KB 5 mM es, otra vez, un inhibidor total de la actividad deshidrogenasa, mientras que el KIC 5 mM, al igual que en cerebelo, no tiene ningún efecto sobre el enzima.

Cabe destacar que la actividad deshidrogenasa hepática es del mismo orden que la de islotes, y 5 veces menor que la cerebelar.



**Figura 27: Actividad semialdehído succínico deshidrogenasa en hígado, por absorbancia. Efecto del KIC 5 mM y del KB 5 mM.** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y al coeficiente de extinción molar para el NADH ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo sobre 10  $\mu\text{l}$  del extracto de hígado (250 mg tejido fresco/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 4 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

## 1.2.- CARACTERIZACIÓN, EN RATA, DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR FLUORESCENCIA

Aprovechando la propiedad fluorescente del NAD(P)H y que supone un método de detección mucho más sensible, estudiamos ambas actividades siguiendo la variación de la fluorescencia emitida por el cofactor en presencia o ausencia de varios cetoácidos que hemos seleccionado para caracterizar ambas enzimas. Además, al ser un método mucho más sensible, nos permite aprovechar al máximo el escaso material de trabajo que supone nuestro tejido de estudio, los islotes.

Para poder calcular los moles del cofactor que son reducidos u oxidados, según el caso, se ha llevado a cabo una recta patrón para cada uno. De manera que cada uno de ellos tiene una ecuación de conversión de RFU (unidades de fluorescencia) a  $\mu\text{moles}$  de NAD(P)H:

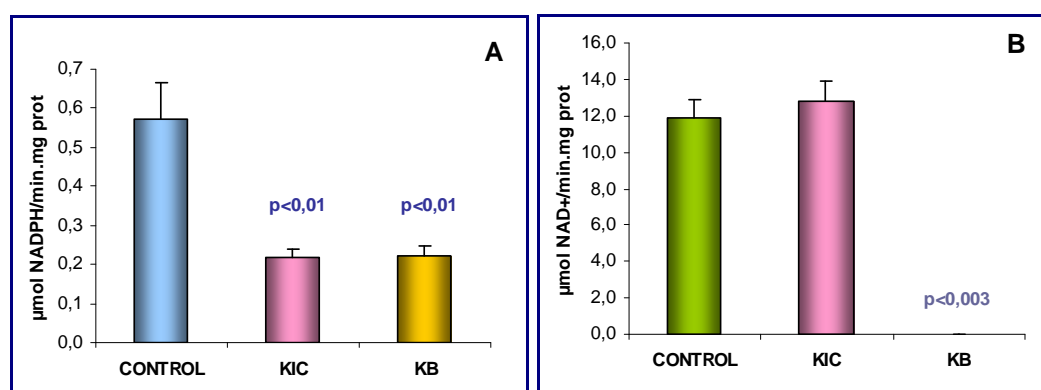
$$\mu\text{moles NADPH} = \left( \frac{(\text{RFU} - 1,8742)}{187,06} \right) \times 250$$

$$\mu\text{moles NADH} = \left( \frac{(\text{RFU} - 2,0596)}{141,09} \right) \times 250$$

### 1.2.1.- Valoración en cerebelo

En este caso probamos el efecto de un cetoácido secretagogo (KIC) y de un cetoácido no secretagogo (KB) sobre ambas enzimas.

La SSA-R, al igual que ocurría en la valoración enzimática por absorbancia, se ve inhibida por los dos compuestos, aunque, a diferencia que en las medidas por absorbancia, la capacidad inhibitoria registrada por fluorescencia, es ligeramente mayor. El KIC 5 mM y el KB 5 mM inhiben al enzima en un 60% (figura 28A). En el caso de la deshidrogenasa, los resultados son iguales que los obtenidos en las medidas por absorbancia. El KB 5 mM es el único que tiene un drástico efecto inhibitorio sobre el enzima, ya que ejerce una inhibición total de la actividad (figura 28B).



**Figura 28: Medida, por fluorescencia, del efecto de KIC 5mM y KB 5 mM sobre la actividad enzimática de los enzimas SSA-R (A) y SSA-dh (B) en cerebelo de rata.** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y a la recta patrón de NADH o de NADPH realizadas con anterioridad. Los experimentos se llevaron a cabo en 12,5 µl del extracto de cerebelo (250 mg cerebelo/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

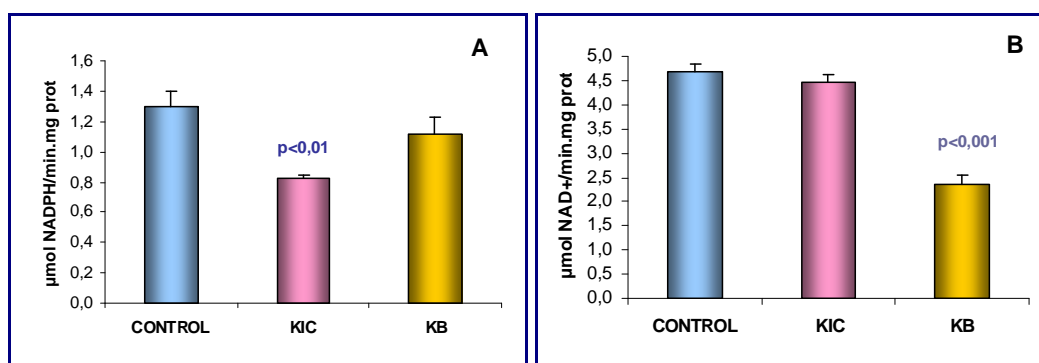
A diferencia de las medidas por absorbancia, donde la actividad deshidrogenasa es 6.3 veces mayor que la reductasa, con esta técnica, la diferencia asciende a 24 veces, ya que aunque la actividad deshidrogenasa es del mismo orden ( $15.93 \pm 5.96$  µmoles NADH/min.mg proteína, valorado por absorbancia, vs.  $11.91 \pm 0.98$  µmoles NADH/min.mg proteína, valorado por fluorescencia), la actividad reductasa es 5 veces menor en el caso de la valoración por fluorescencia ( $2.54 \pm 0.14$  µmoles NADH/min.mg

proteína, valorado por absorbancia, vs.  $0.57 \pm 0.09$   $\mu\text{moles NADH/min.mg proteína}$ , valorado por fluorescencia).

### 1.2.2.- Valoración en islotes pancreáticos

Se exploró el efecto de los dos cetoácidos empleados con anterioridad: KIC 5 mM y KB 5 mM.

Al igual que en las medidas de la actividad en islotes por absorbancia, la SSA-R no se ve afectado por KB 5 mM. El KIC 5 mM también inhibe la actividad reductasa, aunque menos que lo visto anteriormente, tan sólo reduce su actividad en un 35% (figura 29A). En el caso de la SSA-dh, los resultados son más sorprendes ya que, si bien el KIC 5 mM no tiene ningún efecto (al igual que lo observado en las medidas por absorbancia), el KB 5 mM, a diferencia de lo visto en el apartado 1.1.2, inhibe la SSA-dh. No llega a ser una inhibición total, como ocurre en el caso del cerebelo, pero sí reduce su actividad en un 50% (figura 29B).



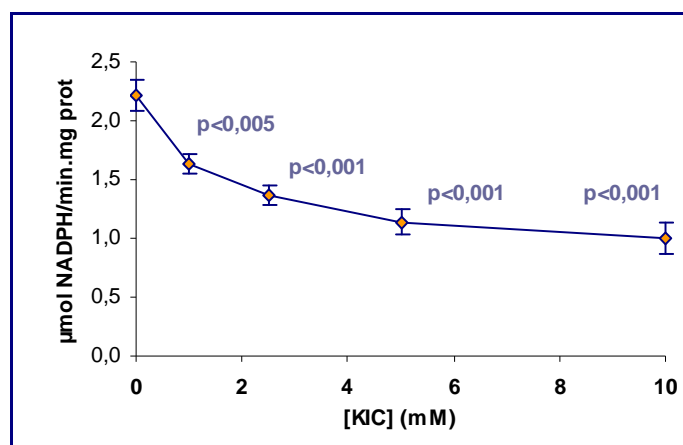
**Figura 29: Medida, por fluorescencia, del efecto de KIC 5mM y KB 5 mM sobre la actividad enzimática de los enzimas SSA-R (A) y SSA-dh (B) en islotes pancreáticos de rata.** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y a la recta patrón de NADH o de NADPH realizadas con anterioridad. Los experimentos se llevaron a cabo en 25  $\mu\text{l}$  del extracto de islotes (~ 12 islotes / $\mu\text{l}$ ). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

A diferencia de los resultados obtenidos tras la valoración enzimática por absorbancia (donde ambas actividades eran del mismo orden), con esta técnica, la deshidrogenasa presenta el doble de actividad que la reductasa. En cuanto a la relación con estas mismas actividades en el cerebelo, aunque no se mantiene la proporción, se sigue midiendo más actividad reductasa en los islotes pancreáticos, de manera que en el

islote es 3 veces mayor que en cerebelo. Pero en el caso de la deshidrogenasa, al igual que lo ocurrido en absorbancia, presenta una actividad 2 veces mayor en cerebelo que en islotes.

#### 1.2.2.1.- Caracterización de la inhibición de la SSA-R por KIC

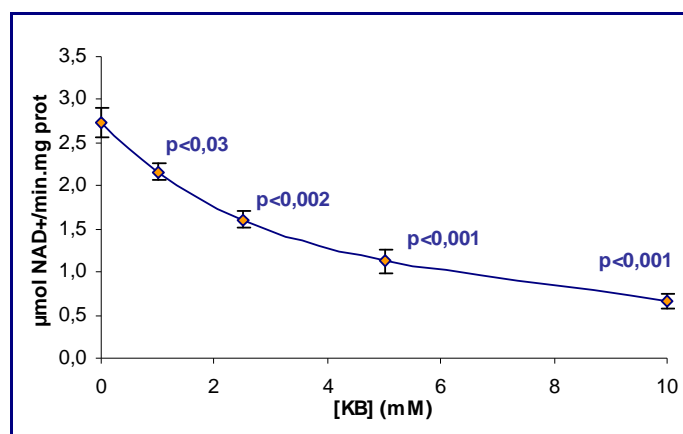
Para intentar caracterizar el efecto inhibitorio del KIC sobre la SSA-R, estudiamos el efecto de concentraciones crecientes de KIC desde 1 mM hasta 10 mM. Ninguna de estas concentraciones fue capaz de superar una inhibición superior al 50%, alcanzándose la máxima inhibición a la concentración de 2,5 mM, y siendo su  $ED_{50}$  1,2 mM (figura 30).



**Figura 30: Dosis respuesta del enzima SSA-R frente a varias concentraciones de KIC (medido por fluorescencia).** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y a la recta patrón de NADPH realizada con anterioridad. Los experimentos se llevaron a cabo en 25  $\mu$ l del extracto de islotes (~ 12 islotes / $\mu$ l). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

#### 1.2.2.2.- Caracterización de la inhibición de la SSA-dh por KB

Para intentar caracterizar el efecto inhibitorio del KB sobre la SSA-dh, estudiamos el efecto de concentraciones crecientes de KB desde 1 mM hasta 10 mM. La máxima inhibición ejercida por el KB es a la dosis de 10 mM, y la tendencia es a alcanzar una inhibición total (figura 31). La  $ED_{50}$  es 4.1 mM.



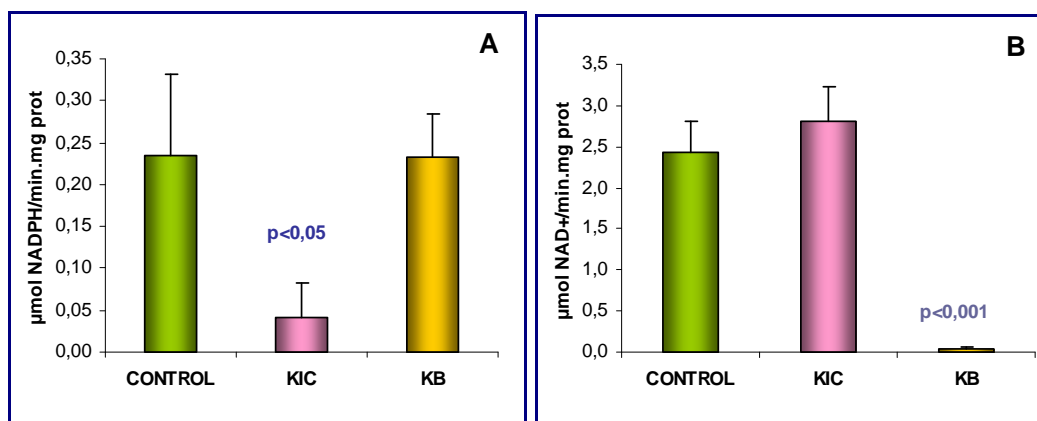
**Figura 31: Dosis respuesta del enzima SSA-dh frente a varias concentraciones de KB (medido por fluorescencia).** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y a la recta patrón de NADH realizada con anterioridad. Los experimentos se llevaron a cabo en 25  $\mu$ l del extracto de islotes ( $\sim 10$  islotes/ $\mu$ l). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 4 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student

### 1.2.3.- Valoración en hígado

Al igual que en casos anteriores, ensayamos ambas actividades en presencia de KIC 5 mM y de KB 5 mM.

En hígado, la actividad reductasa es 10 veces menor que la actividad deshidrogenasa, y al igual que ocurre en los otros tejidos, el KIC inhibe la actividad reductasa. En el caso del hígado, esta inhibición es de un 80%. El KB, que no tiene ningún efecto sobre la reductasa, inhibe casi totalmente la actividad deshidrogenasa (figura 32).

Tanto la actividad SSA-R, como la actividad SSA-dh de hígado son especialmente reducidas, en comparación con la actividad registrada en cerebelo o en islotes. La actividad deshidrogenasa es 2 veces menor que la de islotes y 5 veces menor que la de cerebelo. La actividad reductasa es 5 veces menor que la de islotes y 2 veces menor que la de cerebelo. Ésta es la razón por la que, por absorbancia, es prácticamente imposible medir esta actividad. Pero al usar un valoración fluorimétrica, que es más sensible, sí fuimos capaces de detectar la pequeña actividad SSA-R hepática.



**Figura 32: Medida, por fluorescencia, del efecto de KIC 5mM y KB 5 mM sobre la actividad enzimática de los enzimas SSA-R (A) y SSA-dh (B) en hígado de rata.** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y a la recta patrón de NADH o de NADPH realizadas con anterioridad. Los experimentos se llevaron a cabo en 10  $\mu\text{l}$  del extracto de hígado (250 mg tejido fresco/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 4 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

## 2.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DOS ENZIMAS DEL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍlicos: $\alpha$ -CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA Y SUCCÍNICO DESHIDROGENASA.

Estas dos enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos están muy implicadas en el metabolismo del GABA. La  $\alpha$ -KG-dh es la encargada de transformar el  $\alpha$ -cetoglutarato en succinil-coenzima A, de manera que estaría disminuyendo el pool de  $\alpha$ -KG disponible para ser transaminado junto a GABA y contribuir a su degradación. Por otro lado, la succínico deshidrogenasa es la encargada de transformar el ácido succínico en ácido fumárico, por lo tanto, es la que integra en el TCA los carbonos provenientes del GABA.

Por esta razón, se ha estudiado el efecto que los mismos cetoácidos, que tenían un efecto inhibitorio sobre las SSA-R y SSA-dh, pueden tener sobre estos enzimas.

### 2.1.- CARACTERIZACIÓN, EN RATA, DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR ABSORBANCIA

Ya que el KB parece ser un inhibidor de la SSA-dh, nos planteamos la posibilidad de que también inhibiese otros enzimas deshidrogenasa, como la succínico deshidrogenasa o la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa.

### 2.1.1.- Actividad succínico deshidrogenasa

El cetobutírico 5 mM tiende a disminuir la actividad succínico deshidrogenasa cerebelar en un 25% (aunque no resultó ser estadísticamente significativo). El mismo enzima, en los otros dos tejidos estudiados, se ve reducido en un 30% por el KB 5 mM (tabla 4).

En islotes, la actividad succínico deshidrogenasa es la mayor de los tres tejidos estudiados. Es 3 veces mayor que la de hígado y 6 veces mayor que la de cerebelo. De los tejidos estudiados, el que menor actividad relativa presenta es el cerebelo.

	CONTROL	+KB 5 mM	
CEREBELO	0,56±0,06	0,41±0,04	ns
ISLOTES	3,12±0,33	2,23±0,11	p<0,03
HÍGADO	1,06±0,08	0,73±0,08	p<0,03

**Tabla 4: Medida de la actividad succínico deshidrogenasa en presencia y ausencia de KB 5 mM, en los tres tejidos estudiados.** Se empleó un método colorimétrico basado en la capacidad del DCPIP para disminuir su absorción a 600 nm cuando es reducido en la cadena respiratoria. Los resultados ( $\mu\text{mol DCPIP}/\text{min.mg proteína}$ ) están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y al coeficiente de extinción molar para el DCPIP ( $\epsilon_{600\text{nm}} = 21 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo en 25  $\mu\text{l}$  del extracto de cerebelo (250 mg tejido/ml), 25  $\mu\text{l}$  del extracto de islotes (~ 6 islotes / $\mu\text{l}$ ) y en 10  $\mu\text{l}$  del extracto de hígado (250 mg tejido/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

### 2.1.2.- Actividad $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa

La actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa se pudo medir tanto en cerebelo, como en hígado, pero en islotes, el aparato rozaba los límites de detección y las pendientes eran tan pequeñas que en algunos casos eran prácticamente nulas (tabla 3). Posiblemente la actividad específica es tan limitada, que el método espectrofotométrico no es suficientemente sensible como para detectar el NADH generado. Aún así, se han reflejado en la tabla 5 los resultados correspondientes a islotes.



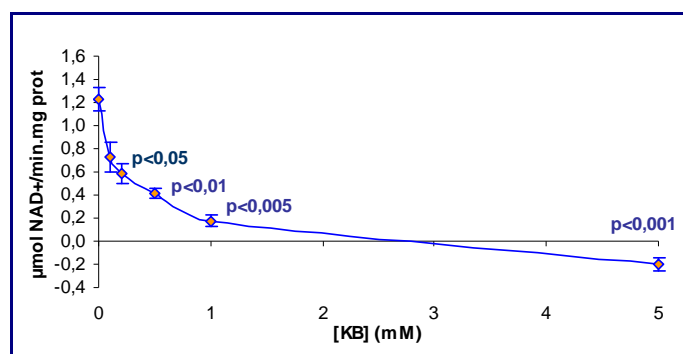
En cualquier caso, tanto en cerebelo como en hígado, se pudo observar que la inhibición por KB 5 mM era total (tabla 5), al igual que ocurría con la SSA-dh. En el caso de los islotes, la inhibición parece ser, tan sólo, del 50%, pero estos resultados están por confirmar por fluorescencia, que es un método mucho más sensible.

La actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa cerebelar y de islotes es del mismo orden, y la hepática es 6 veces mayor que las anteriores.

	CONTROL	+KB 5 Mm	
<b>CEREBELO</b>	2,70 $\pm$ 0,24	-0,05 $\pm$ 0,07	p<0,001
<b>ISLOTES</b>	2,58 $\pm$ 0,34	1,27 $\pm$ 0,02	p<0,05
<b>HÍGADO</b>	12,24 $\pm$ 0,22	-0,27 $\pm$ 0,01	p<0,001

**Tabla 5: Medida, por absorbancia, de la actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en presencia o ausencia de KB 5 mM, en los tres tejidos estudiados.** Los resultados ( $\mu$ mol NADH/min.mg proteína) están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y al coeficiente de extinción molar para el NADH ( $\epsilon_{340nm} = 6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo en 25  $\mu$ l del extracto de cerebelo (250 mg tejido/ml), 25  $\mu$ l del extracto de islotes (~ 6 islotes / $\mu$ l) y en 10  $\mu$ l del extracto de hígado (250 mg tejido/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

Al igual que en casos anteriores, se caracterizó esta inhibición mediante la realización de una dosis respuesta de la  $\alpha$ -KG-dh de cerebelo frente a diferentes concentraciones de KB (figura 33), presentando una ED50 de 0.55 mM.



**Figura 33: Dosis respuesta de la actividad del enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa cerebelar frente a cetobutírico.** Se analizó, por absorbancia, el efecto de concentraciones

crecientes de KB, desde 0.1 mM hasta 5 mM. Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y al coeficiente de extinción molar para el NADH ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo en 25  $\mu\text{l}$  del extracto de cerebelo (250 mg tejido fresco/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

## 2.2.- CARACTERIZACIÓN, EN RATA, DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR FLUORESCENCIA

Debido a la imposibilidad de registrar correctamente la actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en islotes pancreáticos de rata, decidimos valorar esta actividad registrando las variaciones de fluorescencia del NADH, que es un método mucho más sensible que el anterior. La actividad succínico deshidrogenasa no puede registrarse mediante fluorescencia ya que el método de estudio es colorimétrico, no se basa en registrar la variación de absorbancia del NADH, como el resto de los enzimas estudiadas.

Al igual que para las actividades SSA-R y SSA-dh, en este caso también usaremos una ecuación para convertir las RFU en  $\mu\text{moles}$  de NADH:

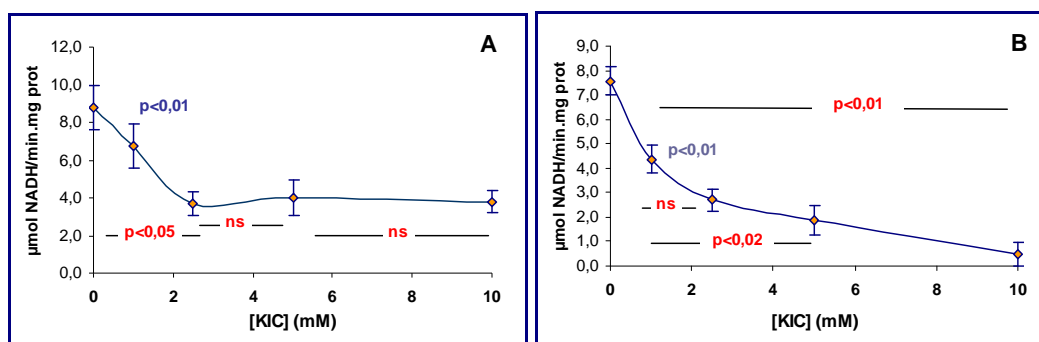
$$\mu\text{moles NADH} = \left( \frac{(\text{RFU} - 2,0596)}{141,09} \right) \times 250$$

Al ser un método mucho más sensible, fuimos capaces de medir la actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en todos los tejidos estudiados (tabla 4). La actividad en los tres tejidos resultó estar en el mismo orden de magnitud, y también en el mismo orden que los resultados obtenidos por absorbancia. Se probaron dos cetogácidos secretagogos (KIC y KMV) y uno no secretagogo (KB). Los tres cetogácidos tuvieron un efecto negativo sobre esta actividad enzimática. El KIC 5 mM inhibió la actividad cerebelar en un 65%, la de islotes en un 80% y la de hígado en un 90%. El KB 5 mM redujo la actividad deshidrogenasa en un 75% en el caso de los islotes, pero inhibió totalmente los enzimas cerebelar y hepática. El KMV 5 mM, por el contrario, inhibió en un 80% la actividad enzimática cerebelar y en un 100% la pancreática y la hepática (tabla 6).

	CEREBELO ( $\mu\text{mol NADH/min. mg prot}$ )		ISLOTES ( $\mu\text{mol NADH/min. mg prot}$ )		HÍGADO ( $\mu\text{mol NADH/min. mg prot}$ )	
CONTROL	6,13 $\pm$ 0,49	--	7,21 $\pm$ 1,28	--	4,42 $\pm$ 0,59	--
KIC 5 Mm	2,16 $\pm$ 0,34	p<0,0001	1,55 $\pm$ 0,31	p<0,002	0,36 $\pm$ 0,18	p<0,0001
KB 5 mM	0,10 $\pm$ 0,05	p<0,0001	1,84 $\pm$ 0,23	p<0,002	0,04 $\pm$ 0,04	p<0,0001
KMV 5 mM	1,02 $\pm$ 0,26	p<0,0001	-0,04 $\pm$ 0,05	p<0,001	-0,71 $\pm$ 0,00	p<0,004

**Tabla 6: Medida, por fluorescencia, de la actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en presencia y ausencia de tres cetoácidos, en los tres tejidos estudiados.** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y a la recta patrón de NADPH realizada con anterioridad. Los experimentos se llevaron a cabo en 12,5  $\mu\text{l}$  del extracto de cerebelo (250 mg tejido/ml), 25  $\mu\text{l}$  del extracto de islotes (~12 islotes / $\mu\text{l}$ ) y en 12,5  $\mu\text{l}$  del extracto de hígado (250 mg tejido/ml). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

Para caracterizar la inhibición por KIC se llevó a cabo una dosis respuesta tanto en cerebelo como en islotes pancreáticos (figura 34). En el enzima cerebelar (figura 34A), la mayor inhibición se alcanza ya a una dosis de 2,5 mM, siendo su  $\text{ED}_{50}$  1,25 mM, y no superando, con ninguna de las concentraciones probadas, una supresión de su actividad del 55%. Sin embargo, en el caso del enzima pancreático (figura 34B), a la máxima concentración de KIC ensayada (10 mM), se alcanza una inhibición casi total, siendo su  $\text{ED}_{50}$  4.7 mM.



**Figura 34: Dosis respuesta del enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenada frente a cetioisocaproico en cerebelo (A) y en islotes pancreáticos (B).** Se analiza, por fluorescencia, el efecto de concentraciones crecientes de KIC, desde 1 mM hasta 10 mM. Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y a la recta patrón de NADPH realizada con anterioridad. Los experimentos se llevaron a cabo en 12,5  $\mu\text{l}$  del extracto de cerebelo (250 mg tejido/ml), 25  $\mu\text{l}$  del extracto de islotes (~ 12 islotes / $\mu\text{l}$ ). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

En el anexo I se presenta una tabla resumen de las actividades enzimáticas valoradas por los dos métodos de detección, el espectrofotométrico y el fluorescente. Se representan las cuatro actividades valoradas en los tres tejidos estudiados.

## A2.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para el estudio de la expresión génica se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa en la que, para todos los genes estudiados, se usó el rRNA 18S como gen control (*house-keeping*).

En la tabla 7 se ha analizado, para cada tejido, la expresión relativa de cada gen respecto al gen de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. En islotes, los genes más expresados son los de los enzimas GAD 65 y GABA-T, que son los que sintetizan y catabolizan el GABA, respectivamente, en la célula  $\beta$ . Están 7.5 y 5.5 veces más expresados que la  $\alpha$ -KG-dh. Los menos expresados, además del gen de la  $\alpha$ -KG-dh, son los genes de la SSA-dh y de la SSA-R, que se encuentran expresados, respectivamente, 1.3 y 0.5 veces el gen de la  $\alpha$ -KG-dh. El gen de la succínico deshidrogenasa se expresa 2.5 veces más que el de la  $\alpha$ -KG-dh. Por lo tanto, se puede afirmar que los genes de los enzimas que afectan directamente al GABA (GAD 65 y GABA-T), están más expresados en este tejido, que incluso los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Y que los genes de los enzimas que metabolizan el producto de degradación del GABA hacia el ciclo de Krebs (SSA-dh) o hacia GHB (SSA-R), además de expresarse menos que los anteriores, están expresados en una proporción 3:1.

	ISLOTES		CEREBELO		HÍGADO	
<b><math>\alpha</math>-KG-dh</b>	100,0 $\pm$ 24,3	--	100,0 $\pm$ 18,3	--	100,0 $\pm$ 22,2	--
<b>SUCC-dh</b>	259,2 $\pm$ 18,3	p<0,0005	976,8 $\pm$ 19,5	p<0,0001	593,3 $\pm$ 30,9	p<0,0001
<b>SSA-R</b>	52,9 $\pm$ 27,6	ns	86,0 $\pm$ 26,6	ns	378,6 $\pm$ 28,7	p<0,0003
<b>SSA-dh</b>	131,1 $\pm$ 20,8	ns	658,3 $\pm$ 15,2	p<0,0001	321,2 $\pm$ 51,2	p<0,009
<b>GAD 65</b>	757,9 $\pm$ 20,4	p<0,0001	411,9 $\pm$ 18,9	p<0,0003	--	
<b>GABA-T</b>	556,3 $\pm$ 22,2	p<0,0001	553,9 $\pm$ 10,3	p<0,0001	927,0 $\pm$ 34,6	p<0,0001

**Tabla 7: Expresión de los genes de los enzimas relacionados con el metabolismo del GABA.**

**Analizados por tejidos.** Los resultados expresan el valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm$  S.E.M., en porcentaje, de un grupo experimental de 6 (islotes), 3 (cerebelo) o 4 (hígado) individuos. El valor  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , para cada

gen, se calculó respecto al gen  $\alpha$ -KG-dh, en cada uno de los tejidos. Los resultados fueron analizados estadísticamente aplicando el método T de Student a los valores medios y S.E.M. de  $2^{-\Delta Ct}$  de cada uno de los genes calculado en función del gen control GAPDH.

En cerebelo, que es un tejido típicamente GABAérgico, la expresión del GAD65 es, tan sólo, 4 veces la del gen de la  $\alpha$ -KG-dh. Aunque la expresión de la GABA-T, al igual que en islotes, es 5.5 veces la del gen control. El gen de la SSA-dh está bastante expresado en cerebelo (6.5 veces respecto al gen de la  $\alpha$ -KG-dh), aunque el de la SSA-R, paralelamente a lo expresado en islotes, tan sólo se expresa 0.8 veces respecto al control. El gen de la succínico deshidrogenasa se expresa casi 10 veces más que el gen de la  $\alpha$ -KG-dh. En este tejido, además del gen del GAD65, que genera GABA, se expresan, predominantemente, los genes de los enzimas que metabolizan el GABA hacia succínico (GABA-T y SSA-dh) y el gen de la succínico deshidrogenasa, que incluye los carbonos que provienen del GABA en el ciclo de Krebs. El gen de la SSA-R, que es el enzima que genera GHB a partir de SSA, está mucho menos expresado.

En hígado, no se expresa el gen del GAD 65, como era de esperar. Sin embargo, el gen de la GABA-T se expresa 9 veces más que el de la  $\alpha$ -KG-dh. Los genes de la SSA-R y de la SSA-dh están expresados 3.5 veces más que el gen control, y la succínico deshidrogenasa, 6 veces más. En este tejido se expresan los genes de aquellos enzimas que degradan el GABA, pero no el del enzima que lo genera (GAD65).

En la tabla 8 se ha analizado la expresión de cada uno de los genes de los diferentes tejidos en comparación con el mismo gen expresado en islotes. La expresión de la  $\alpha$ -KG-dh en cerebelo e hígado es 4 y 5.5 veces la de islotes, mientras que la de succínico deshidrogenasa es 14 y 12 veces mayor, respectivamente. No existen diferencias significativas en la expresión de estos dos genes entre hígado y cerebelo.

En el caso de los dos enzimas que metabolizan el semialdehído succínico, las diferencias son mucho mayores. Mientras que la reductasa se expresa 6 veces más en cerebelo que en islotes, esta relación aumenta a 40 veces en el caso del hígado. Sin embargo, la deshidrogenasa, se expresa 19 y 13 veces más, respectivamente. Y mientras que la expresión de la deshidrogenasa en los tejidos no pancreáticos no es estadísticamente significativa, la de la reductasa sí lo es ( $624,0 \pm 26.5\%$  vs.  $3940,7 \pm 28.7\%$ ;  $p < 0.03$ ). Es decir, que la expresión de la SSA-R es mucho mayor en hígado que en ninguno de los otros tejidos estudiados, y mucho mayor que la expresión de la SSA-dh.

	2-KG-dh		SUCC-dh	
ISLOTES	100,0±24,3	c	100,0±18,3	c
CEREBELO	383,6±18,3	p<0,002	1445,7±19,5	p<0,001
HÍGADO	550,4±22,2	p<0,007	1260,0±30,9	p<0,006
	SSA-R		SSA-dh	
ISLOTES	100,0±27,6	c	100,0±20,8	c
CEREBELO	624,0±26,5	p<0,02	1926,4±15,2	p<0,001
HÍGADO	3940,7±28,7	p<0,003	1348,9±51,1	p<0,05
	GAD 65		GABA-T	
ISLOTES	100,0±20,4	c	100,0±22,2	c
CEREBELO	208,5±18,9	p<0,05	381,9±10,3	p<0,001
HÍGADO	--		917,18±34,6	p<0,02

**Tabla 8: Expresión de los genes de los enzimas relacionados con el metabolismo del GABA.**

**Analizados por genes.** Los resultados expresan el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  S.E.M. en porcentaje de un grupo experimental de 6 (islotes), 3 (cerebelo) o 4 (hígado) individuos. El valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , para cada uno de los genes de cada tejido, se calculó respecto al mismo gen expresado en islotes. Los resultados fueron analizados estadísticamente aplicando el método T de Student a los valores medios y S.E.M. de  $2^{-\Delta Ct}$  de cada uno de los genes calculado en función del gen control GAPDH.

En cuanto a la expresión del gen del GAD 65 cabe destacar que la expresión en islotes es casi del mismo orden que la de cerebelo. La diferencia de expresión es la menor de todos los genes estudiados, tan sólo 2 veces más expresada en cerebelo que en islotes. Y como cabría esperar, este gen no se expresa en tejido hepático. La GABA-T también se encuentra bastante expresada en islotes respecto a cerebelo, ya que este gen, al igual que el de la  $\alpha$ -KG-dh, tan sólo está 4 veces más expresado en cerebelo que en islotes. El hígado, que presenta una gran expresión de los genes que codifican para los enzimas de la maquinaria de degradación del GABA, expresa 9 veces más el gen de la GABA-T que los islotes y 5 veces más que el cerebelo.

## DISCUSIÓN PARCIAL

Las actividades enzimáticas medidas, tanto por absorbancia como por fluorescencia, son equivalentes entre sí, con la diferencia de que las valoraciones por

fluorescencia nos han permitido cuantificar la actividad SSA-R en hígado y la actividad  $\alpha$ -KG-dh en islotes, que en la valoración por absorbancia, estaban rozando el límite de detección del aparato. Esto, además de la ventaja evidente que supone el hecho de ser capaces de detectar estas actividades enzimáticas, añade otra ventaja metodológica: el ahorro de tejido que supone el método de detección fluorescente. En este método reducimos el volumen final de reacción desde 500  $\mu$ l hasta 250  $\mu$ l. Al poner el mismo volumen del lisado tisular, estamos aumentando al doble su concentración final. En el caso de cerebelo e hígado, esto no es especialmente importante, pero sí lo es en el caso de los islotes. En el método fluorescente hemos aumentado la concentración inicial del lisado tisular al doble (de 6 isl/ $\mu$ l a 12 isl/ $\mu$ l) respecto a las medidas realizadas por absorbancia, lo que significa que la concentración real de las proteínas del islote en el momento de la medida de la actividad enzimática es cuatro veces la alcanzada en la valoración espectrofotométrica. Además, hay que tener en cuenta que la detección fluorescente es más sensible que la espectrofotométrica. Todo esto es importante, porque significa que con el mismo número de islotes somos capaces de valorar, fluorimétricamente, actividades como la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, que no son mensurable con el otro método empleado, el espectrofotométrico.

La actividad SSA-R se ve inhibida, en todos los tejidos, en mayor o menor medida, por KIC 5 mM y no se ve afectada por KB 5 mM. La inhibición por KIC varía entre el 40 y el 75%. Sin embargo, la actividad SSA-dh no se ve afectada por KIC 5 mM, pero sí por KB 5 mM, que en todos los casos, a excepción de los islotes pancreáticos, bloquea totalmente la actividad deshidrogenasa. El caso de los islotes marca una diferencia con el resto de tejidos estudiados, ya que el KB no inhibe en absoluto la actividad semialdehído succínico deshidrogenasa registrada por absorbancia y, en un 50%, la registrada por fluorescencia. Esto establece una diferencia con los enzimas de los otros tejidos, que podría estar indicando la presencia, en islotes, de una isoforma de SSA-dh específica de tejido. La diferencia de efecto del KB 5 mM en islotes según el método de medida puede deberse a la mayor sensibilidad del método fluorescente, que es capaz de registrar variaciones menores que las que se registran por absorbancia.

Los islotes pancreáticos son el único tejido en el que ambas actividades (SSA-R y SSA-dh) son del mismo orden de magnitud, ya que, tanto en cerebelo como en hígado, la actividad SSA-dh es un orden de magnitud mayor que la actividad SSA-R. Según los datos de expresión génica, en cerebelo, el gen de la deshidrogenasa está 7 veces más expresado que el de la reductasa, lo que coincide con la valoración de la actividad enzimática. En islotes, el gen de la deshidrogenasa se expresa el doble que el de la

reductasa, aunque la diferencia no es significativa, lo que está en consonancia con lo visto en actividad enzimática. En cuanto a la expresión génica en hígado, ambos genes se expresan lo mismo, aunque la actividad enzimática es 10 veces mayor para la SSA-dh que para la SSA-R. Estas diferencias pueden deberse a que en el registro de la actividad enzimática en hígado, el “ruido” de fondo ha sido muy elevado, tanto en las medidas por absorbancia, como en las medidas por fluorescencia, por lo que, además de registrarse pendientes muy reducidas (tras la sustracción del blanco, que es elevado debido al excesivo “ruido” que presenta el lisado hepático), es posible que gran parte del NADH o del NADP<sup>+</sup> generados en las reacciones específicas, se estuviese consumiendo inespecíficamente y, por lo tanto, infravalorando los valores de actividad. Esta misma explicación se puede aplicar al hecho de que si se valora la expresión del gen de la deshidrogenasa hepática respecto al mismo gen, pero en islotes, la expresión es 10 veces mayor en hígado que en islotes, aunque los valores de actividad son el doble en islotes que en hígado. Lo mismo puede decirse de la reductasa, que según su expresión génica es 40 veces mayor en hígado, pero según las valoraciones de actividad enzimática es 6.5 veces mayor en islotes. El problema reside, muy probablemente, en la alta actividad basal que existe en los lisados hepáticos, y que no existe ni en cerebelo ni en islotes.

La actividad succínico deshidrogenasa se ve inhibida en un 30% por el KB 5 mM en los tres tejidos estudiados. El tejido en el que más actividad se registra es en islotes, donde la actividad es 3 veces mayor que en hígado, y 6 veces mayor que en cerebelo. Sin embargo, en cuanto a expresión génica se refiere, el tejido en el que menos se expresa el gen de la succ-dh es en los islotes pancreáticos, siendo 10 veces mayor la expresión tanto en cerebelo, como en hígado. El método de detección de la succínico deshidrogenasa está basado en la reducción de un compuesto, el DCPIP, tras el transporte de electrones por la cadena respiratoria. Al igual que lo sucedido para la SSA-R y SSA-dh hepáticas, posiblemente, la existencia de otras actividades enzimáticas pueda estar consumiendo electrones que deberían reducir el DCPIP. Al no tratarse de una solución pura del enzima, los tejidos que más masa proteica aporten, como es el caso del cerebelo, y sobre todo del hígado, pueden interferir más en la medida de ciertos enzimas.

Al igual que los otros enzimas deshidrogenasa estudiados, la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, se ve inhibida totalmente por KB 5 mM, a excepción del enzima de los islotes, que tan sólo se inhibe en un 65%, lo que al igual que en el caso de la SSA-dh, podría estar representando la existencia de una isoforma específica de tejido. A



diferencia de los otros enzimas deshidrogenasa, la  $\alpha$ -KG-dh sí se ve inhibida por KIC 5 mM casi en su totalidad, en el caso de islotes e hígado, y en un 65% en el caso del enzima cerebelar. La actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa es del mismo orden en los tres tejidos estudiados y la expresión génica se encuentra en el mismo orden de magnitud, aunque es 4 veces mayor en cerebelo que en islotes y 5.5 veces mayor en hígado que en islotes.

Según los datos de expresión génica (tabla 7), en cerebelo, la SSA-dh se expresa 6 veces más que la SSA-R y que la  $\alpha$ -KG-dh. Y esto es lo que se refleja en las medidas de actividad enzimática, donde la actividad SSA-dh es 6 veces mayor que la actividad SSA-R y que la actividad  $\alpha$ -KG-dh. En islotes, la expresión génica de los tres genes es muy similar (de hecho, las diferencia de expresión no son estadísticamente significativas) y las actividades enzimáticas son también del mismo orden. Y en el caso del hígado, la expresión génica de la reductasa y la deshidrogenasa es 3 veces mayor que la de la  $\alpha$ -KG-dh, mientras que en actividad enzimática la SSA-dh y la  $\alpha$ -KG-dh son del mismo orden, pero la SSA-R es 10 veces menor. Pero como he comentado con anterioridad, los valores de actividad enzimática medidos en hígado conllevan un error intrínseco debido al elevado “ruido” del experimento.

El hecho de que los valores de expresión génica y actividad enzimática se expliquen mucho mejor si se comparan dentro de un mismo tejido que si se comparan entre los tres tejidos estudiados no es de extrañar ya que, aunque se ha intentado usar un gen control lo más constante posible, se ha descrito en varios estudios que es prácticamente imposible encontrar un gen que se exprese de forma constante en todo los tejidos o en todas las especies (117). Según el estudio llevado a cabo por Zhu y Altmann (117) sobre la continuidad de la expresión de diferentes genes control en varios tejidos estudiados, el gen del GAPDH se encuentra 4 veces más expresado en cerebro que en hígado, y el de la  $\beta$ -actina, 2 veces más expresado. Sin embargo, las diferencias de expresión del rRNA 18S entre todos los tejidos estudiados son mucho menores (inferiores al 10%). El gen que se use como gen control (*housekeeping*) debe ser aquel que nos permita poder analizar y comparar la expresión génica de un mismo gen entre varios tejidos distintos, además de comparar la expresión de varios genes dentro de un mismo tejido. Por esta razón se eligió como gen control (*housekeeping*) el rRNA 18S, en vez de otros genes como la  $\beta$ -actina o el GAPDH.

## **B.- ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN RELACIÓN CON EL GABA Y SU METABOLISMO.**

En el estudio de la secreción de insulina se han usado dos procedimientos distintos. Por un lado, se ha estudiado el efecto que varios inhibidores de los enzimas del *shunt* del GABA pueden tener sobre la secreción de insulina inducida por glucosa, tras una hora de incubación a 37°C. De esta manera se puede valorar el efecto de determinadas sustancias sobre la secreción global de insulina. Por el otro lado, se ha comprobado cómo se comportan los islotes en perfusión frente al propio GABA y frente a tolbutamida, que es una sulfonilurea que actúa sobre la subunidad *Sur1* del canal de potasio dependiente de ATP ( $K^+_{ATP}$ ), de manera que lo cierra, generando una depolarización celular y desencadenando la exocitosis de insulina. De esta manera, se está mimetizando el efecto del ATP sobre la secreción de insulina. El GABA al incluirse en las SLMVs estaría consumiendo ATP (80), y esto podría estar afectando directamente a los canales de  $K^+_{ATP}$  e inhibiendo la secreción de insulina. Al añadir tolbutamida estamos eliminando esta posibilidad, ya que mantiene cerrados los canales de  $K^+_{ATP}$ , independientemente del contenido de ATP celular.

El estudio de la secreción en incubaciones estáticas nos da una idea del efecto global que tienen determinadas sustancias. Sin embargo, mediante el estudio de la secreción en perfusión, se pueden visualizar las dos fases que caracterizan la secreción de insulina y nos da una información más específica acerca de los efectos concretos de estas sustancias. Es decir, que nos ayuda a caracterizar mejor el efecto de las mismas.

## **B1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL GABA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA**

Se ha descrito con anterioridad que la glucosa puede dirigir parte del GABA hacia su catabolismo mitocondrial, y que de esta manera, disminuiría el GABA disponible en la célula (75, 84). Por lo tanto, cuando aumenta la glucosa en la célula  $\beta$ , la cantidad de GABA disminuye, lo que se corresponde con un aumento de la secreción de insulina.

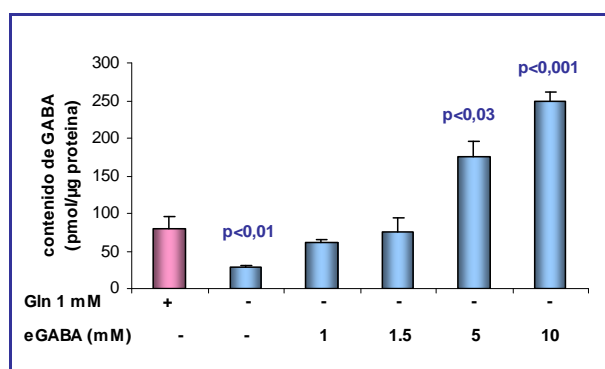
También se ha propuesto (97), que el GABA presente en la célula puede estar actuando de manera negativa sobre la secreción de insulina debido a que está utilizando parte del ATP, necesario para depolarizar la membrana celular, en incluirse en vesículas (SLMVs). Este gasto de ATP, y la no depolarización celular, contribuirían a disminuir la secreción de insulina.

Para probar esta teoría, hemos diseñado una serie de experimentos en los que hemos querido comprobar la inhibición por parte del GABA de la secreción de insulina, para lo que hemos usado un precursor permeable del GABA, el etil-GABA (eGABA). También hemos querido comprobar cómo afecta el GABA a la electrofisiología celular, que tan estrechamente relacionada está con los niveles de ATP y con la exocitosis de los gránulos de insulina.

### 1.- CONTENIDO DE GABA EN PRESENCIA DE eGABA Y GLUTAMINA 1 mM.

Por un lado, hemos comprobado que la hidrólisis del eGABA dentro del islote produce cantidades crecientes de GABA y que el contenido de GABA producido por eGABA 1 mM es comparable con el GABA producido a partir de glutamina 1mM (concentración fisiológica). Para ello, hemos incubado 30 islotes en 70  $\mu$ l de Krebs-Ringer bicarbonato suplementado con glutamina 1 mM o diferentes concentraciones de GABA. Posteriormente, se valoró el contenido de aminoácidos, tras extraer con sulfosalicílico y derivatizar con o-ftalaldehído, según se detalla en “Materiales y métodos”.

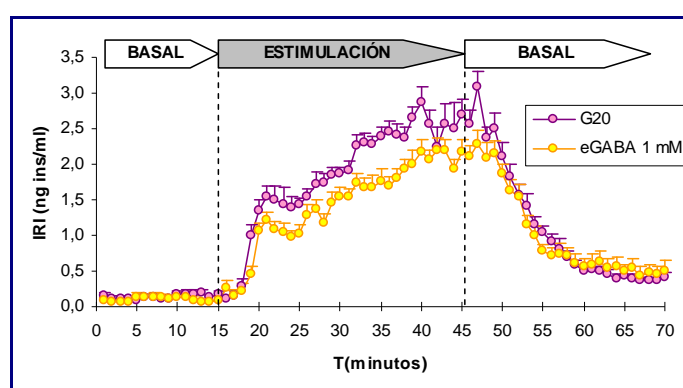
El contenido de GABA aumenta de manera dosis dependiente con la concentración de eGABA extracelular, y además la cantidad de GABA producido por la glutamina 1 mM es equivalente a la producida por eGABA 1 mM (figura 35).



**Figura 35: Contenido de GABA en presencia de diferentes concentraciones de eGABA y de glutamina.** Grupos de 30 islotes fueron expuestos, por triplicado, durante 1 hora a glutamina 1 mM (barra rosa) o a concentraciones crecientes de eGABA (barras azules). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6-7 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student, usando como valor control el correspondiente a glutamina 1 mM. (Gln: glutamina; eGABA: etil-GABA).

## 2.- EFECTO DEL GABA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA

Como el eGABA 1 mM produce la misma cantidad de GABA que la glutamina 1 mM, quisimos comprobar el efecto que tenía sobre la secreción de insulina estimulada por una concentración saturante de glucosa, glucosa 20 mM. Hemos podido constatar que el eGABA, a una dosis 1 mM, es capaz de afectar la secreción de insulina estimulada por glucosa 20 mM (figura 36). El periodo global de estimulación se ve ligera, pero significativamente inhibido por eGABA 1 mM en un 25% (tabla 9). Y aunque la primera fase de estimulación no se ve afectada (primeros 10 minutos del periodo de estimulación), la segunda fase sí se ve significativamente reducida en un 23%.

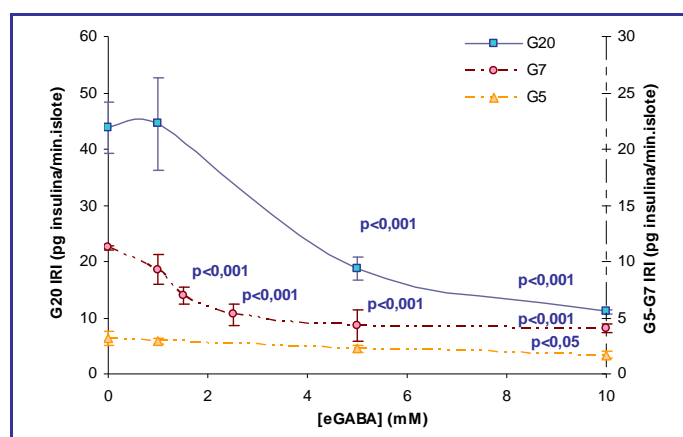


**Figura 36:** Perfusión de islotes expuestos a glucosa 20 mM (círculos rosas) y a glucosa 20 mM + eGABA 1 mM (círculos amarillos). El grupo expuesto a eGABA 1 mM fue pre-perfundido, durante los últimos tres minutos del periodo basal previo al periodo de estimulación. Cada punto representa el valor medio  $\pm$  S.E.M. de los ng insulina/min secretados, en cada minuto, por grupos de 40 islotes, de un grupo experimental de 12 individuos.

	G20	G20 + eGABA	
30 minutos de estimulación	56,0 $\pm$ 2,9	42,2 $\pm$ 3,2	p<0,005
10 primeros minutos de la estimulación	10,0 $\pm$ 1,1	7,6 $\pm$ 0,9	ns
20 segundos minutos de la estimulación	45,7 $\pm$ 2,3	35,4 $\pm$ 2,3	p<0,005
70 minutos totales	85,4 $\pm$ 5,6	67,2 $\pm$ 5,5	p<0,03

**Tabla 9:** Insulina (ng) total secretada por los 40 islotes en el periodo de tiempo indicado en la perfusión de la figura 12. Los resultados representan el valor medio  $\pm$  S.E.M. de la insulina secretada por 40 islotes (ng insulina/min) en los periodos de tiempo indicados, de un grupo experimental de 12 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

Para establecer la dosis de eGABA más apropiada para poder caracterizar su acción sobre la secreción de insulina, ensayamos su efecto a través de la realización de una dosis respuesta de la secreción de insulina estimulada por glucosa 5, 7 y 20 mM frente a distintas concentraciones de eGABA, desde 1 hasta 10 mM (figura 37). Se eligieron estas tres concentraciones porque representan, respectivamente, la concentración basal de glucosa, a la que se registra una secreción basal, la concentración mínima de glucosa que desencadena una respuesta bifásica por parte de los islotes, y una concentración de glucosa saturante, frente a la que los islotes presentan una respuesta secretora muy elevada. Cuando se estimulan los islotes con glucosa 5 mM, la secreción es escasa y sólo se ve ligeramente disminuida por eGABA 10 mM, mientras que al igual que lo visto en el caso de la perfusión, 5 mM de eGABA no produce ningún efecto. La estimulación por glucosa 7 mM es la más sensible a la presencia de eGABA, ya que 1.5 mM del mismo es capaz de producir una disminución significativa de la secreción, alcanzándose el máximo a 5 mM. Sin embargo, 20 mM de glucosa no se afecta negativamente por eGABA hasta que este no se añade a una concentración de 5 mM.

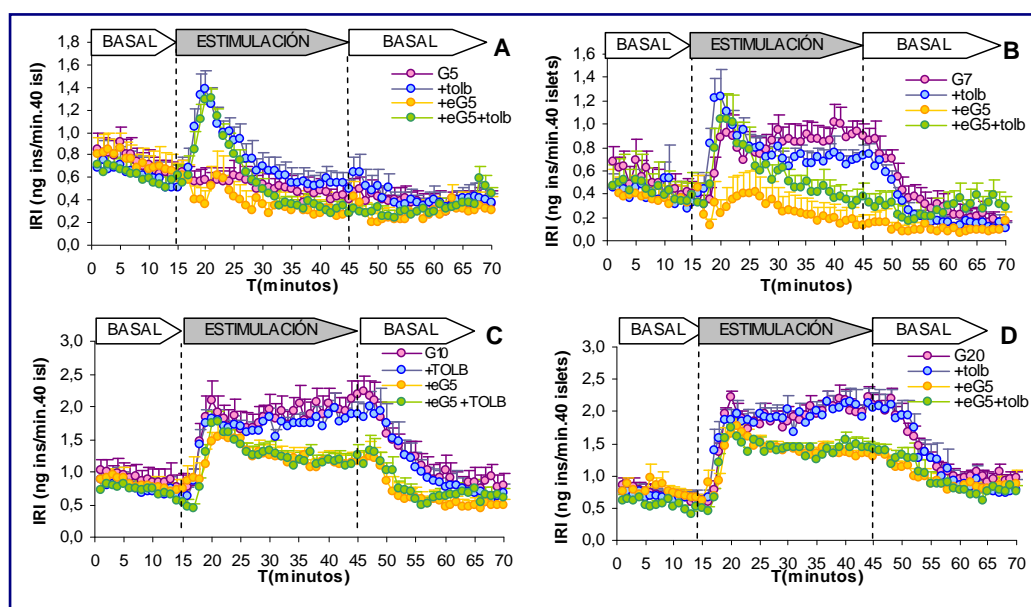


**Figura 37: Dosis respuesta de la secreción de insulina, inducida por glucosa 5 mM, 7 mM y 10 mM, frente a concentraciones crecientes de eGABA.** Los experimentos fueron llevados a cabo durante una hora, en incubaciones estáticas de 10 islotes en 1 ml de medio de incubación específico para cada condición. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 12 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

El eGABA a una dosis de 5 mM, que supone un incremento del contenido de GABA dentro del islote de 2.2 veces sobre el contenido alcanzado en presencia de glutamina 1 mM, es la dosis mínima para que, a la concentración saturante de glucosa, se pueda detectar el efecto inhibitorio del GABA, así que probamos su efecto sobre la

secreción de insulina en perfusiones de islotes. De esta manera, comprobamos que, además de inhibir la secreción de insulina durante todo el periodo de estimulación (figura 38D) (tabla 10), también es capaz de inhibir el pico máximo de secreción de la primera fase inducida por glucosa 20 mM ( $2,21 \pm 0,10$  vs.  $1,66 \pm 0,13$ ;  $p < 0,005$ ,  $n=9$ ). Por lo tanto, se usó la dosis de 5 mM de eGABA para caracterizar la inhibición por GABA y el posible efecto sobre la disminución de ATP disponible.

Cuando se exponen los islotes a glucosa basal (5 mM) (figura 38A), el eGABA no surte ningún efecto, pero al exponerlos a tolbutamida y cerrar los canales de potasio, la depolarización celular provoca la aparición de la primera fase de secreción, aunque no la segunda. Por lo que se podría decir, que en cierta medida, la primera fase es directamente dependiente de los canales de potasio, pero no la segunda.



**Figura 38:** Perfusión de islotes que se han sometido al efecto de tres concentraciones distintas de glucosa en presencia o ausencia de eGABA 5 mM y de tolbutamida 200  $\mu$ M. En el caso del grupo experimental expuesto a eGABA, se realiza una pre-perifusión de tres minutos en el periodo basal previo al de estimulación. Los resultados representan el valor medio  $\pm$  S.E.M. de la insulina secretada por 40 islotes (ng insulina/min) en los periodos de tiempo indicados, de un grupo experimental de 6 (A), 6 (B), 7 (C) y 9 (D) individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

Cuando se exponen los islotes a cantidades de glucosa a las que la célula  $\beta$  presenta una respuesta de secreción máxima, como es 20 mM, el eGABA es capaz de inhibir, tan sólo, la segunda fase de secreción, pero no la primera (figura 38D). En el

caso de una concentración elevada de glucosa, como es 10 mM (figura 38C), que ronda la concentración fisiológica máxima alcanzada (11.1 mM), la primera fase está disminuida en el caso de la adición de eGABA 5 mM, aunque no llega a ser estadísticamente significativo. La segunda fase, al igual que en los otros casos, también está disminuida. La tolbutamida, en estas condiciones no ejerce ningún efecto ni sobre la secreción global estimulada únicamente por glucosa, ni sobre la secreción estimulada por glucosa y eGABA. Sin embargo, a nivel más particular, y en todos los casos estudiados, se puede observar que cuando los islotes se exponen a eGABA, se retrasa un par de minutos la aparición del primer pico de secreción, pero cuando se expone a eGABA junto con tolbutamida, se restaura el pico en el mismo minuto en el que aparece en la condición control (glucosa) (figura 38).

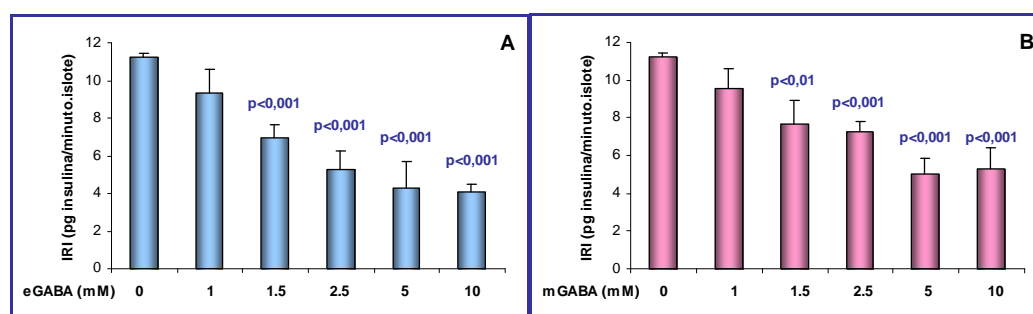
	<b>G5</b>		<b>G5+TOLB</b>		<b>G5+eGABA5</b>		<b>G5+eG5+TOLB</b>	
	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p*</b>
<b>30 min. estim.</b>	19,3±3,5	--	25,6±4,2	ns	13,1±4,4	ns	20,2±2,5	ns
<b>10 primeros min. estim.</b>	5,9±1,3	--	10,5±1,7	<0,05	5,8±1,4	ns	10,1±1,2	<0,05
<b>20 segundos min. estim.</b>	12,4±2,4	--	15,1±2,5	ns	7,3±3,0	ns	10,1±1,5	ns
<b>70 min. totales</b>	43,2±7,9	--	47,8±9,6	ns	30,8±9,3	ns	38,0±5,1	ns
	<b>G7</b>		<b>G7+TOLB</b>		<b>G7+eGABA5</b>		<b>G7+eG5+TOLB</b>	
	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p*</b>
<b>30 min. estim.</b>	24,5±3,8	--	23,5±2,4	ns	8,3±3,8	<0,02	17,2±4,1	ns
<b>10 primeros min. estim.</b>	6,2±1,3	--	8,4±1,1	ns	2,1±0,3	<0,03	7,1±1,6	<0,02
<b>20 segundos min. estim.</b>	18,3±2,5	--	15,1±1,5	ns	5,1±2,7	<0,01	10,2±2,5	ns
<b>70 min. totales</b>	41,0±7,5	--	36,0±4,7	ns	15,9±6,8	<0,04	30,3±8,9	ns
	<b>G10</b>		<b>G10+TOLB</b>		<b>G10+eGABA5</b>		<b>G10+eG5+TOLB</b>	
	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p*</b>
<b>30 min. estim.</b>	53,7±6,5	--	50,3±4,1	ns	37,3±4,1	<0,05	36,7±3,7	ns
<b>10 primeros min. estim.</b>	14,9±2,3	--	14,0±1,2	ns	12,0±1,6	ns	11,8±1,1	ns
<b>20 segundos min. estim.</b>	38,9±4,2	--	36,3±3,1	ns	25,3±2,8	<0,02	24,9±2,6	ns
<b>70 min. totales</b>	95,6±14,1	--	87,7±9,5	ns	64,6±8,4	ns	65,5±8,5	ns
	<b>G20</b>		<b>G20+TOLB</b>		<b>G20+eGABA5</b>		<b>G20+eG5+TOLB</b>	
	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p</b>	<b>MEDIA</b>	<b>p*</b>
<b>30 min. estim.</b>	56,7±2,9	--	55,3±5,0	ns	41,8±2,2	<0,001	42,0±1,9	ns
<b>10 primeros min. estim.</b>	15,0±0,9	--	15,5±1,5	ns	12,8±0,8	ns	12,2±0,6	ns
<b>20 segundos min. estim.</b>	41,7±2,4	--	40,6±3,7	ns	29,1±1,8	<0,001	29,8±1,6	ns
<b>70 min. totales</b>	99,3±5,2	--	109,8±3,6	ns	79,3±6,4	<0,03	76,1±6,2	ns

**Tabla 10: Insulina (ng) total secretada por los 40 islotes en el periodo de tiempo indicado en la perfusión de la figura 13.** Los islotes se expusieron a glucosa 5, 7, 10 y 20 mM en presencia o ausencia de tolbutamida 200 µM y eGABA 5 mM. Los resultados representan el valor medio ± S.E.M. de la insulina secretada por 40 islotes (ng insulina/min) en los periodos de tiempo indicados, de un grupo experimental de 6, 6, 7 y 9 individuos, respectivamente. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. Se tomó como condición control los resultados de la secreción estimulada por glucosa (a las dosis correspondientes en

cada caso), salvo para la condición estimulada con glucosa, eGABA 5 mM y tolbutamida 200  $\mu$ M, cuya condición control es glucosa + eGABA 5 mM ( $p^*$ ).

La glucosa 7 mM es suficiente para estimular la secreción bifásica de insulina, pero no es aún suficiente como para desencadenar el máximo efecto secretor por parte de las células  $\beta$ . En estas condiciones, el eGABA 5 mM es capaz de inhibir tanto la primera, como la segunda fase de la secreción (figura 38B) (tabla 10). Y la adición de tolbutamida es capaz de restaurar tan sólo la primera fase, no así la segunda.

Cuando el precursor permeable del GABA (eGABA) penetra en la célula se hidroliza en GABA y etanol, por lo que para descartar cualquier posible artefacto producido por el producto hidrolizado del eGABA en el interior celular (etanol), quisimos comprobar el efecto de otro precursor permeable del GABA, el éster metílico del mismo: mGABA. Para ello, llevamos a cabo una dosis respuesta de la secreción de insulina estimulada por la concentración de glucosa más sensible a la presencia de GABA (glucosa 7 mM), frente a distintas concentraciones de ambos precursores (desde 1 mM hasta 10 mM) (figura 39A: eGABA y 39B: mGABA)



**Figura 39: Dosis respuesta de la secreción de insulina, inducida por glucosa 7 mM, frente a concentraciones crecientes de eGABA y mGABA.** Los experimentos fueron llevados a cabo durante una hora, en incubaciones estáticas de 10 islotes en 1 ml de medio de incubación específico para cada condición. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 12 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

El mGABA se comporta igual en cuanto al contenido de GABA que se alcanza en el interior de los islotes. Se valoró el contenido producido por una concentración de mGABA de 1.5 mM, y resultó no diferir ni del contenido alcanzado tras la incubación con eGABA 1.5 mM ( $118.25 \pm 36.15$  pmol/ $\mu$ g proteína,  $n=6$  vs.  $74.55 \pm 19.70$  pmol/ $\mu$ g proteína,  $n=4$ ; ns) ni con el contenido alcanzado tras la incubación con glutamina 1 mM ( $118.25 \pm 36.15$  pmol/ $\mu$ g proteína,  $n=6$  vs.  $78.93 \pm 16.82$  pmol/ $\mu$ g proteína,  $n=4$ ; ns). La



cantidad de GABA que produce el eGABA 5 mM tampoco difiere de la alcanzada con mGABA 5 mM ( $175.30 \pm 21.33$  pmol/ $\mu$ g proteína,  $n=11$  vs.  $195.69 \pm 33.23$  pmol/ $\mu$ g proteína,  $n=6$ ; ns). El mGABA 5 mM, además, incrementa el contenido de GABA de manera significativa respecto al GABA producido en presencia de glutamina 1 mM ( $78.93 \pm 16.82$ ,  $n=4$  vs.  $195.69 \pm 33.23$ ,  $n=6$ ;  $p<0.03$ ) (incremento de 2.4 veces), de igual manera que lo hacía el eGABA 5 mM ( $78.93 \pm 16.82$ ,  $n=4$  vs.  $175.30 \pm 21.33$ ,  $n=11$ ;  $p<0.03$ ) (2.2 veces).

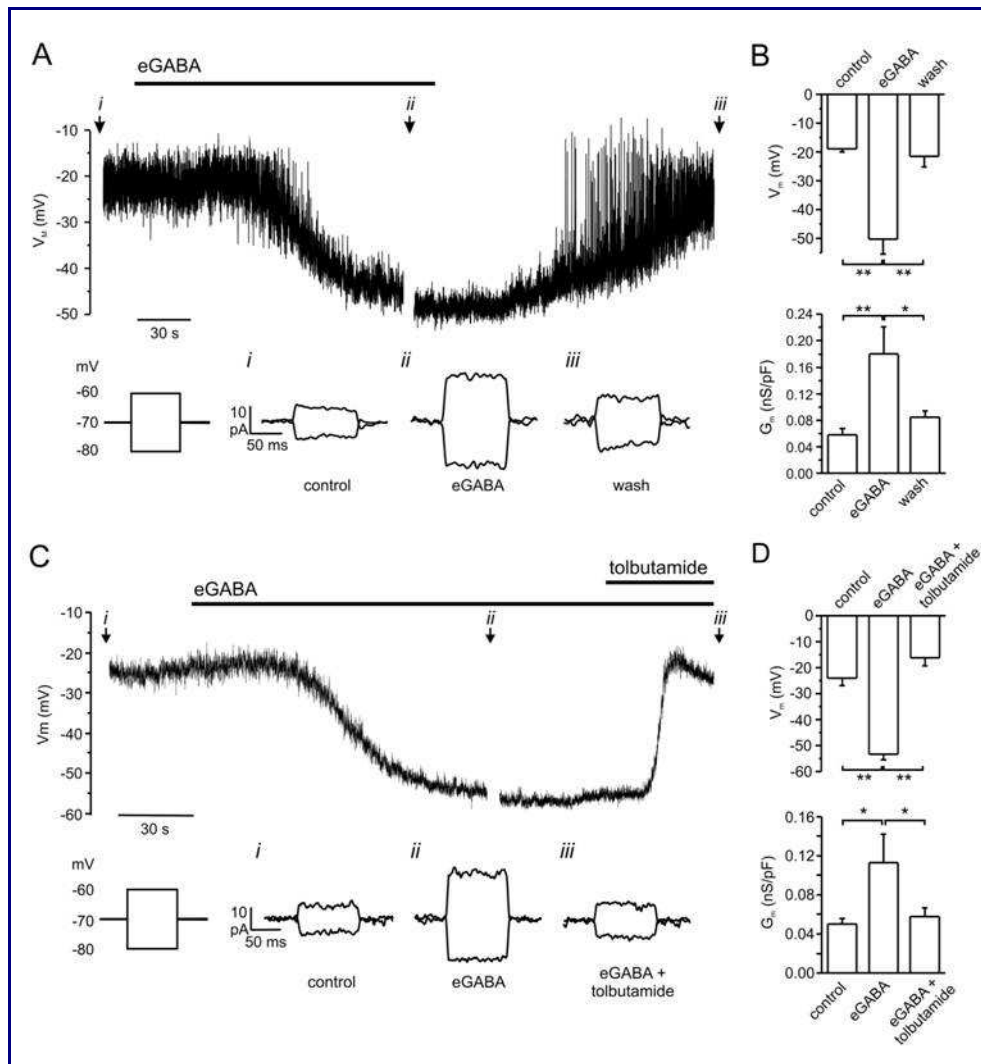
Para eliminar también la posibilidad de que el etanol producido tras la hidrólisis del eGABA en el interior celular pueda estar afectando la secreción de insulina, valoramos el efecto que pudiese tener sobre la misma. Pudimos comprobar que no existe ninguna variación de la secreción por ninguna de las dos concentraciones ensayadas, respecto a la condición basal (tabla 11).

	MEDIA	P
G7	$8,51 \pm 2,17$	--
G7 + etOH 0,02%	$9,10 \pm 1,36$	ns
G7 + etOH 0,03%	$9,53 \pm 1,04$	ns

**Tabla 11: Secreción de insulina estimulada por glucosa 7 mM en presencia o ausencia de etanol.** Los islotes fueron expuestos a glucosa 7 mM, a glucosa y etanol al 0.02% (v/v) o a glucosa y etanol al 0.03%. Los experimentos fueron llevados cabo durante 1 hora, en incubaciones estáticas de 10 islotes en 1 ml del medio de incubación específico para cada condición. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 7 individuos. (ns: no significativo)

### 3.- EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DEL ATP SOBRE LA CÉLULA $\beta$ .

En colaboración con los profesores Mathias Braun y Patrick Rorsman, del Centro para la Diabetes de la Universidad de Oxford, hemos desarrollado un estudio electrofisiológico del efecto del GABA sobre las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos de rata, para intentar caracterizar mejor la forma en la que el GABA inhibe la secreción de insulina inducida por glucosa.



**Figura 40: Medida del potencial de membrana de una células  $\beta$ , en presencia de glucosa 10 mM (configuración: “*perforated patch whole-cell*”; célula completa perforada).** En los paneles A y C superiores se representan las medidas del potencial de membrana en presencia de glucosa 10 mM, eGABA 5 mM y tolbutamida 100  $\mu$ M, donde se indica. Las medidas fueron interrumpidas para medir la conductancia de la membrana (parte inferior de los paneles A y C), donde aparece indicado por las flechas y las letras i-iii. En los paneles B y D se representan los valores medios  $\pm$  S.E.M. para el potencial de membrana ( $V_m$ ) (parte superior) y para la conductancia de la misma ( $G_m$ ) (parte inferior) de un grupo experimental de 5-6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente por el método T de Student. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ )

En las figuras 40A y 40B aparece representada la medida del potencial de membrana y de la conductancia iónica, medido en una célula  $\beta$  metabólicamente intacta, en presencia de glucosa 10 mM. En la condición control (i), en la que no hay eGABA en el exterior celular, por lo que tampoco hay GABA en el interior celular, el potencial de membrana es de -20 mV, es decir, que la membrana está depolarizada. La glucosa 10

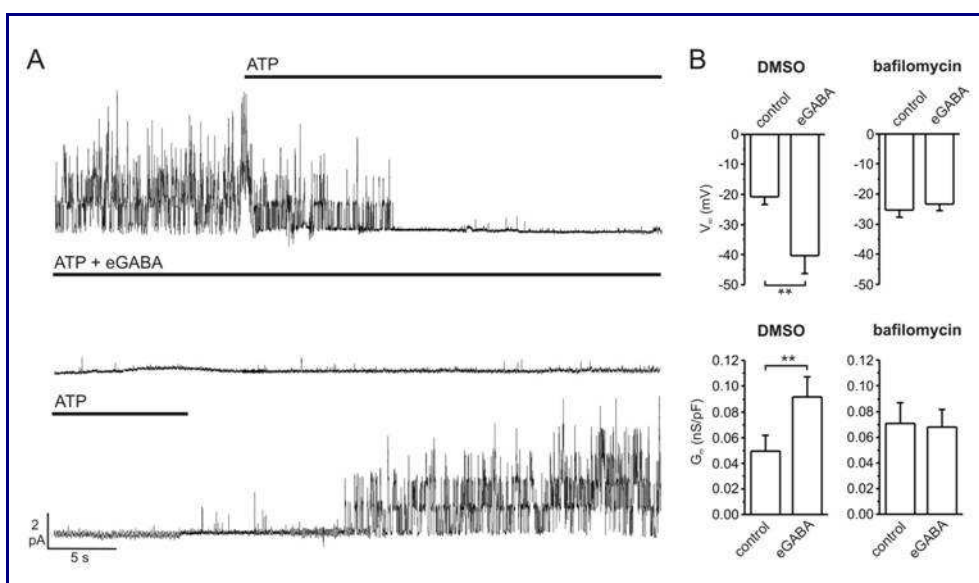
mM está generando suficiente ATP como para cerrar los canales  $K^+_{ATP}$  y producir la depolarización celular que conlleva la exocitosis de los gránulos de insulina. En estas condiciones, la conductancia iónica es reducida. Sin embargo, cuando se añade eGABA 5 mM, y éste penetra en la célula  $\beta$ , se aprecia una clara hiperpolarización de la membrana, que alcanza un potencial de -50 mV (ii), aumentando claramente la conductancia iónica. Cuando el eGABA es lavado del medio extracelular, se restaura el potencial de membrana de la condición control (depolarizada) (iii) y la conductancia disminuye, también, hasta los niveles control. Cuando se añade tolbutamida 100  $\mu$ M al entorno celular, se produce una rápida depolarización y una disminución clara de la conductancia (figura 40C y 40D). Es decir, que los efectos que ejerce el eGABA tanto sobre el potencial de membrana, como sobre la conductancia iónica, se pueden atribuir a la afectación de los canales  $K^+_{ATP}$ . Al añadir tolbutamida y cerrar los canales  $K^+_{ATP}$ , se vuelve a depolarizar la membrana, aún en presencia de eGABA 5 mM.

Se ha demostrado con anterioridad que las células  $\beta$  de rata expresan tanto el receptor  $GABA_B$ , como una proteína G asociada a este receptor (76, 118). Para descartar que el efecto sobre el potencial de membrana, que estamos viendo, se deba a la unión, en la parte externa de la membrana plasmática, del eGABA con este receptor  $GABA_B$ , llevamos a cabo una serie de experimentos en los que se valoró el potencial de membrana producido por la exposición de una célula  $\beta$  a GABA 5 mM. El GABA, a diferencia del eGABA, no penetra en la célula, por lo que es la forma apropiada para estudiar el posible efecto sobre el potencial de membrana o la conductancia que pudiese ejercer a través de los receptores  $GABA_B$ . Pero no se observaron diferencia tras la exposición a GABA 5 mM ni sobre el potencial de membrana ( $-20 \pm 7$  mV,  $n=5$  vs.  $-18 \pm 7$  mV,  $n=5$ ), ni sobre la conductancia iónica ( $0.06 \pm 0.01$  nS/pF,  $n=5$  vs.  $0.05 \pm 0.01$  nS/pF,  $n=5$ ). Es decir, que el GABA no ejerce su efecto sobre el potencial de membrana a través de los receptores metabotrópicos del GABA, sino que su efecto es ejercido desde el interior celular.

También quisimos descartar que el efecto que ejerce el GABA desde el interior celular fuese producido por una acción directa sobre los canales  $K^+_{ATP}$ . Para ello usamos trozos (*patches*) de membrana aislados, de manera que se pudo aislar el efecto de los canales  $K^+_{ATP}$  sobre el potencial de membrana. En la figura 41A se puede ver cómo la adición de ATP 100  $\mu$ M cierra los canales, que estaban previamente abiertos. La adición de eGABA 5 mM no reactiva estos canales. Y no es hasta la retirada del ATP, que los canales de potasio vuelven a abrirse, descartando una acción directa del GABA sobre

los canales de potasio dependientes de ATP o una posible degradación de los mismos tras el proceso experimental.

En la figura 41B se representa el efecto de la preincubación de los islotes con bafilomicina A1 100 nM (inhibidor de la ATPasa de tipo V). Mientras que en la condición control (incubación con DMSO, solvente para la bafilomicina A1) la adición de eGABA 5 mM supone una hiperpolarización de la membrana y un aumento de la conductancia, en el caso de la preincubación con este inhibidor de la V-ATPasa, la adición de eGABA 5 mM carece de efecto alguno.

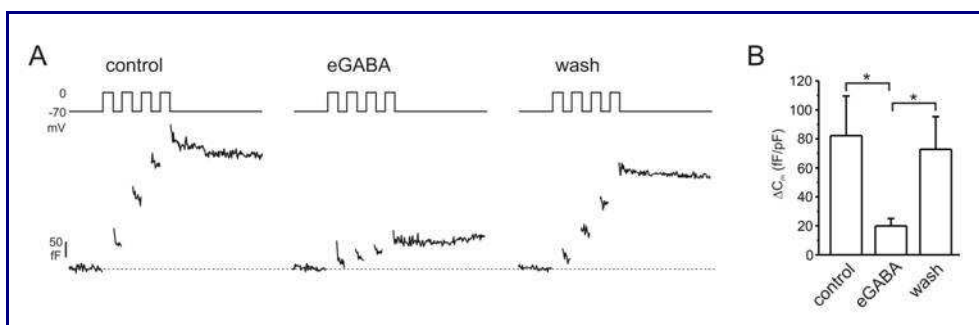


**Figura 41: Efecto del ATP sobre el potencial de membrana y la conductancia.** **A:** Medida de la actividad del canal  $K^+_{ATP}$  (configuración: inside-out membrana patch; trozo de membrana con el interior hacia el exterior). Tanto el ATP 0.1 mM como el eGABA 5 mM se añadieron al medio que baña los trozos de membrana, cuando está indicado en la figura. **B:** se representa el valor medio  $\pm$  S.E.M. del efecto del eGABA, sobre el potencial de membrana ( $V_m$ ) panel superior y sobre la conductancia ( $G_m$ ) (panel inferior), de células pretratadas durante 15 minutos con 0.05% de DMSO (izquierda) (condición control) o con 100 nM de bafilomicina A1 (derecha). Los experimentos se llevaron a cabo en un grupo experimental de 5-6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente por el método T de Student. (\*\* $p < 0.01$ ).

#### 4.- EFECTO DEL GABA SOBRE LA EXOCITOSIS DE LOS GRÁNULOS DE INSULINA

Para investigar el efecto del GABA sobre la secreción de los gránulos de insulina, para comprobar que la hiperpolarización de la membrana que produce, realmente se refleja en una disminución de la exocitosis de los gránulos de insulina,

llevamos a cabo un estudio de la capacitancia de la membrana de una célula completa. La capacitancia es directamente proporcional a la exocitosis registrada en una célula, por lo que cuanto mayor es una, mayor es la otra. En la figura 42 aparece reflejado como, en presencia de glucosa 10 mM, la aplicación de sucesivos pulsos depolarizantes genera un aumento progresivo de la capacitancia. Este aumento se ve reducido en un 75% en presencia de eGABA 10 mM, y se recupera tras la retirada de éste del medio extracelular.



**Figura 42: Valoración del incremento de capacitancia de la membrana (exocitosis) generada por un tren de depolarizaciones (1 Hz cada 2 minutos) (configuración: célula completa).** **A:** Se valoró la capacitancia en las condiciones control (glucosa 10 mM), tras la aplicación de eGABA 5 mM y tras el lavado de esta sustancia. **B:** Se representan los valores medios del aumento de capacitancia  $\pm$  S.E.M. ( $\Delta C_m$ ) normalizados según el tamaño de la célula, de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente por el método T de Student. (\* $p < 0.05$ ).

## DISCUSION PARCIAL

La glutamina plasmática, en condiciones fisiológicas puede llegar a alcanzar valores cercanos a 1 mM (119). Además, es conocido que la glutamina es el principal precursor del GABA (120, 121). Hemos podido comprobar que se produce un incremento progresivo del contenido de GABA en los islotes, tras la incubación con diferentes cantidades de eGABA (figura 35). Además, hemos comprobado también que la cantidad de GABA producido en presencia de eGABA 1 mM es igual que la producida por glutamina 1 mM. Por lo tanto, esta cantidad de GABA, que es posiblemente alcanzable en condiciones fisiológicas a partir de la glutamina plasmática, es capaz de disminuir ambas fases de la secreción de insulina estimulada por glucosa 20 mM, siendo estadísticamente significativa la inhibición ejercida durante los 30 minutos de estimulación en perfusión (figura 36)

Pero para poder caracterizar el efecto del GABA sobre la secreción de insulina, decidimos emplear una concentración mayor, que nos asegurase una inhibición clara. La adición de eGABA 5 mM no tiene efecto sobre la estimulación por glucosa 5 mM, pero sí en el resto de las dosis empleadas, incluso sobre glucosa 20 mM, la concentración de glucosa saturante. Glucosa 5 mM es la concentración basal de glucosa, que no tiene ningún efecto sobre la secreción, así que, lógicamente, es difícil apreciar ningún efecto por parte del eGABA (figura 37).

En condiciones fisiológicas, la concentración de glucosa que se alcanza en plasma tras la ingesta de comida puede llegar hasta 11.1 mM (200 mg/dl) (122), por lo que 10 mM ronda la concentración máxima alcanzada en los islotes pancreáticos en condiciones fisiológicas. La dosis de 20 mM de glucosa supone una concentración saturante, en la que la producción de energía (ATP) en el ciclo de Krebs, alcanza, también, unos niveles elevados. En ambas condiciones se han alcanzado unas concentraciones elevadas de ATP, que por sí mismas, son suficientes para cerrar los canales  $K^+_{ATP}$  y desencadenar la máxima secreción de insulina. En estas condiciones, la adición de eGABA 5 mM produce una inhibición de la segunda fase, pero no de la primera. En experimentos previos en nuestro laboratorio (97) se ha determinado que la presencia de eGABA produce una disminución del contenido de ATP celular. Pero es posible que esta disminución, en presencia de elevadas cantidades de glucosa (20 mM), no sea suficiente como para afectar al cierre de los canales  $K^+_{ATP}$ . Sin embargo, cuando se trata de una estimulación con glucosa 7 mM, que no alcanza los valores máximos de producción de ATP, la adición de eGABA es suficiente para desviar el ATP, que en condiciones normales se usaría para cerrar los canales de potasio, y gastarlo en la inclusión del GABA en las SLMVs. De hecho, en la valoración del potencial de membrana en presencia de glucosa 10 mM, se ha comprobado que el eGABA 5 mM genera una hiperpolarización de la membrana (-50 mV) que alcanza casi los valores de la membrana en reposo (-70 mV) y hace que aumente la conductividad iónica 2.75 veces. En estas condiciones, la capacitancia, la exocitosis de los gránulos de insulina está disminuida en un 75%, por lo que la relación entre presencia de GABA, disminución del contenido de ATP, hiperpolarización, exocitosis y secreción de insulina, está clara en estas condiciones. Sin embargo, cuando se valoró el comportamiento electrofisiológico de la célula  $\beta$  en presencia de glucosa 20 mM y eGABA 5 mM, los resultados fueron distintos a los observados con glucosa 10 mM. El potencial de membrana experimentó una leve hiperpolarización ( $-6 \pm 6$  mV,  $n=5$  vs.  $-16 \pm 7$  mV,  $n=5$ ;  $p<0.05$ ) y la conductancia apenas se vio ligeramente elevada ( $0.05 \pm 0.01$  nS/pF,  $n=4$  vs.  $0.08 \pm 0.02$  nS/pF,  $n=4$ ;  $p<0.01$ ) (1.6 veces).

La adición de tolbutamida 200  $\mu\text{M}$  tan sólo tiene efecto en el caso de la estimulación con glucosa 5 mM y 7 mM. En el caso de glucosa 5 mM, es capaz de desencadenar la primera fase de secreción, que no se estaba dando en presencia del azúcar. Y en el caso de glucosa 7 mM, es capaz de restaurar la primera fase de secreción que había desaparecido al añadir eGABA 5 mM. La tolbutamida cierra los canales de potasio, emulando el efecto del ATP sobre ellos. Es decir, que la primera fase de secreción es totalmente dependiente de los canales  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  y, por lo tanto, del ATP celular. El pico máximo alcanzado, en presencia de tolbutamida, es también dependiente de la cantidad de glucosa presente en la célula  $\beta$ . Cuando está en presencia de concentraciones bajas de glucosa (5 mM y 7 mM), el pico máximo de la primera fase generado por tolbutamida, no difiere entre sí, pero sí de aquel generado en presencia de concentraciones elevadas de glucosa (10 mM y 20 mM). En estas condiciones, además, el pico máximo no difiere entre las situaciones control y las expuestas a tolbutamida. Cuando la glucosa no es muy elevada, el ATP que se está produciendo en el ciclo de Krebs ejerce un efecto menor sobre los canales de potasio que el efecto que ejerce la tolbutamida 200  $\mu\text{M}$  sobre los mismos. Sin embargo, en presencia de concentraciones de glucosa mayores que 10 mM, la cantidad de ATP producido tras la oxidación metabólica del azúcar, produce un efecto sobre los canales que ya es mayor que la depolarización ejercida por la tolbutamida 200  $\mu\text{M}$  y la adición de la sulfunilurea no genera ningún cambio en los picos de secreción ya alcanzados por la glucosa. Tanto los valores de conductancia, como los de potencial de membrana, son rápidamente restaurados a los valores generados por la glucosa 10 mM, cuando, tras la incubación con eGABA 5 mM, son expuestos a tolbutamida 100  $\mu\text{M}$ . Por lo tanto, aparentemente, el efecto sobre el potencial de membrana y sobre la conductancia está siendo ejercido a través de la disminución del contenido de ATP intracelular, lo que está provocando una apertura de los canales  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ . Estos valores se restauran con la adición de tolbutamida, lo que revierte la inhibición de la primera fase de la secreción. Es decir, que en esta primera fase, hay una relación directa entre ATP, canales de potasio y exocitosis de insulina.

La segunda fase de la secreción también se ve inhibida por el eGABA 5 mM, en todos los casos estudiados. Pero, como he explicado anteriormente, el efecto de la tolbutamida sólo se puede apreciar en el caso de la estimulación con glucosa 7 mM. Por lo tanto, voy a basar mis comentarios posteriores en este experimento. La adición de tolbutamida no es capaz de recuperar la segunda fase de la secreción, inhibida previamente por eGABA 5 mM. Aparentemente, no es suficiente con cerrar los canales

de potasio para que la segunda fase tenga lugar. Es decir, que, durante la segunda fase de la secreción, el ATP se está empleando en alguna otra función, diferente al bloqueo de los canales  $K^+_{ATP}$ .

Existen diferentes grupos de gránulos de secreción dentro de la célula  $\beta$ , según su disponibilidad para ser liberados (44). Los que están listos para ser liberados son el grupo ya cebado (RRP), y no constituyen más del 0.3 - 2.2% del total de los gránulos. Estos son los gránulos que, junto al "otro grupo" de gránulos anclados a la membrana (*docked*, 10%), tan sólo necesitan que la membrana celular se depolarice por la acción directa del ATP sobre los canales  $K^+_{ATP}$  y que entre calcio a través de los canales dependientes de voltaje. Estos gránulos son los que se liberan durante la primera fase. Sin embargo, la segunda fase necesita que la glucosa, o un determinado secretagogo, genere una serie de señales que hagan que el último grupo de gránulos, los que se corresponden con la reserva intracelular (90%), sean anclados y cebados a la membrana para ser liberados posteriormente (6).

Por lo tanto, si el GABA inhibe las dos fases, y la tolbutamida es capaz de recuperar tan sólo la primera, es porque el GABA ejerce su acción negativa a través de la disminución de ATP disponible para cerrar los canales de potasio. Pero si la segunda fase no se recupera con la adición de tolbutamida, es porque el ATP, en esta segunda fase, no se emplea en cerrar los canales de potasio, sino que tiene otra función como mensajero intracelular.

Con el propósito de despejar las posibles dudas sobre un posible artefacto generado por el etil-derivado del GABA (eGABA), realizamos ciertas pruebas para descartarlo. Por un lado, probamos el efecto secretor de otro derivado permeable del GABA, su metil-derivado, el metil-GABA (mGABA). Comprobamos, en una dosis respuesta, que ambos inhiben la secreción estimulada por glucosa 7 mM de manera dosis dependiente, alcanzando unos valores similares de inhibición de la secreción (36%-47%) a la concentración máxima ensayada (10 mM) (eGABA:  $4.04 \pm 0.43$  pg insulina/min.islote,  $n=5$  vs. mGABA:  $5.33 \pm 1.07$  pg insulina/min.islote,  $n=5$ ). Además, el contenido de GABA generado por ambos es equiparable entre sí. Por lo tanto, se puede descartar que el efecto del eGABA sea un artefacto producido por el etanol que se genera en el interior celular tras la hidrólisis de este precursor permeable del GABA.

Cuando el eGABA penetra en la célula, es hidrolizado en GABA y en etanol. Con el objeto de descartar la posibilidad de que fuese el etanol el que estaba alterando la



secreción de insulina, también investigamos el efecto de dos concentraciones distintas sobre la secreción estimulada por glucosa 7 mM. Los resultados también descartaron la posibilidad de un efecto inespecífico del etanol.

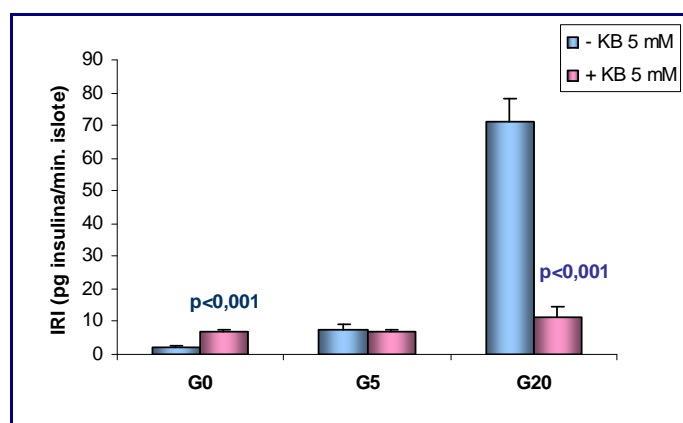
Ya que, como hemos comprobado, el GABA no ejerce su efecto a través de la acción directa ni sobre receptores extracelulares ( $\text{GABA}_B$ ), ni sobre el canal de potasio ( $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ ), desde el interior celular, cobra sentido la idea de que es su inclusión en vesículas, a través del transportador VIAAT, lo que está haciendo disminuir el contenido de ATP celular. El transportador VIAAT transporta GABA al interior vesicular a la vez que transporta al citosol un protón ( $\text{H}^+$ ). Este  $\text{H}^+$  ha sido incluido previamente en las vesículas por la acción de una ATPasa vesicular, hidrolizando una molécula de ATP. Por lo tanto, si inhibimos esta ATPasa, con la bafilomicina A1, estamos impidiendo que se gasten  $\text{ATP}_s$  para incluir  $\text{H}^+$  en las vesículas, y por lo tanto, también impedimos que el GABA se incluya en las mismas, de manera que cesaría su efecto negativo sobre la secreción de insulina. En la figura 40B se puede apreciar que, mientras que el eGABA 5 mM produce una hiperpolarización y un aumento de la conductancia, cuando es añadido en presencia de bafilomicina 100 nM, no produce ningún cambio en ninguno de los dos parámetros. Es decir, que se estaría confirmando la idea de que el gasto de ATP generado por la inclusión de GABA en las vesículas, reduce la exocitosis de los gránulos de insulina, mediante la apertura de los canales de potasio y la hiperpolarización de la membrana plasmática.

## **B2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE VARIOS ENZIMAS DEL *SHUNT* DEL GABA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA**

Una vez caracterizado el efecto del GABA sobre la secreción de insulina, quisimos valorar el efecto que, sobre la secreción de insulina, podría tener inhibir determinados enzimas del *shunt* del GABA. Para ello estudiamos, durante 1 hora, la secreción hormonal producida por 10 islotes estimulados en 1 ml de Krebs-Ringer-bicarbonato suplementado con glucosa, a diferentes concentraciones, en presencia o ausencia de inhibidores conocidos del enzima GAD65/67 (L-alilglicina 10 mM y mercaptopropionico 3 mM) o de cetobutírico 5 mM que, como se ha demostrado anteriormente, es un potente inhibidor de los enzimas SSA-dh (50%), succ-dh (30%) y  $\alpha$ -KG-dh (75%).

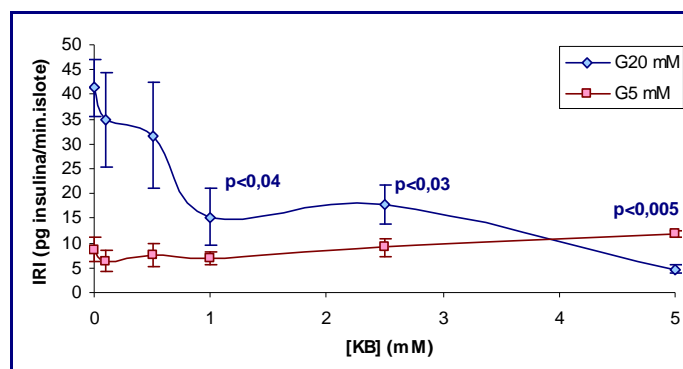
### **1.- EFECTO DEL KB SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA**

Sobre glucosa 20 mM, el KB 5 mM tiene un claro efecto inhibitor, que reduce la secreción en un 85 % ( $70.92 \pm 6.98$  vs.  $11.44 \pm 3.12$ ;  $p < 0.001$ ). Sobre glucosa 5 mM el efecto es aparentemente inexistente, pero en ausencia de algún estímulo secretor, el efecto es potenciador de la secreción (350%) ( $1.91 \pm .70$  vs.  $6.96 \pm 0.67$ ;  $p < 0.001$ ) (figura 43). Sin embargo, si se compara el poder secretor del KB en las tres condiciones estudiadas ( $6.96 \pm 0.67$ ,  $n=6$  vs  $7.01 \pm 0.63$ ,  $n=6$ ; ns.  $6.96 \pm 0.67$ ,  $n=6$  vs.  $11.44 \pm 3.12$ ,  $n=6$ ; ns.  $7.01 \pm 0.63$ ,  $n=6$  vs.  $11.44 \pm 3.12$ ,  $n=6$ ), se puede observar que los picogramos de insulina producidos por minuto y por islote, no varían en los tres casos.



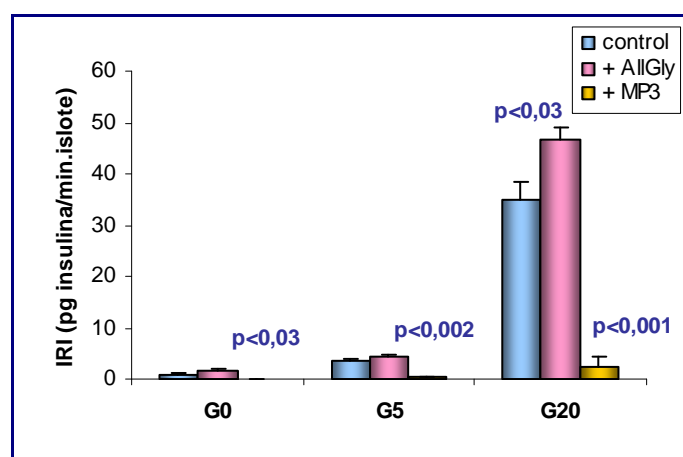
**Figura 43: Efecto del KB 5 mM sobre la secreción de insulina inducida por glucosa.** Los experimentos fueron llevados a cabo durante una hora, en incubaciones estáticas de 10 islotes en 1 ml de medio de incubación específico para cada condición. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

Tratamos de estudiar más a fondo el efecto del cetobutírico sobre la secreción, por lo que llevamos a cabo una dosis respuesta del KB sobre la secreción inducida por glucosa 5 y 20 mM (figura 44). En presencia de glucosa 5 mM, el KB, a las dosis estudiadas, no ejerce ningún efecto. Pero, en presencia de una concentración estimulante de glucosa (20 mM), es capaz de reducir en más de un 60% la secreción de insulina a una dosis de 1 mM ( $41.36 \pm 5.76$  vs.  $15.29 \pm 5.92$ ;  $p < 0.04$ ), alcanzando una inhibición del 88% a la dosis de 5 mM ( $41.36 \pm 5.76$  vs.  $4.72 \pm 0.73$ ;  $p < 0.005$ ).



**Figura 44: Dosis respuesta de la secreción de insulina inducida por glucosa 5 y 20 mM frente a diferentes concentraciones de KB.** Los experimentos fueron llevados a cabo durante una hora, en incubaciones estáticas de 10 islotes en 1 ml de medio de incubación específico para cada condición. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

## 2.- EFECTO DE INHIBIDORES DE GAD65/67 SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA



**Figura 45: Efecto de dos inhibidores de GAD65/67 sobre la secreción de insulina inducida por glucosa.** La L-alilglicina (AllGly) se usó una dosis de 10 mM y el mercaptopropiónico (MP3) a una dosis de 3 mM. Los experimentos fueron llevados a cabo durante una hora, en incubaciones estáticas de 10 islotes en 1 ml de medio de incubación específico para cada condición. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.

Se ha ensayado el efecto que dos inhibidores de GAD65/67 tienen sobre la secreción de insulina inducida por diferentes concentraciones de glucosa (figura 45). La L-alilglicina, pero no su isómero D-alilglicina, es el precursor permeable del verdadero inhibidor del enzima GAD, el 2-oxo-4-pentenoico (123). Y aunque la adición de L-

alilglicina 10 mM no tuvo efecto alguno sobre la secreción en presencia de pequeñas concentraciones de glucosa, sí produjo un ligero aumento secretor (43%) cuando se estimularon los islotes con glucosa 20 mM. El mercaptopropiónico 3 mM, que es un inhibidor mucho más potente del mismo enzima y que no necesita ser metabolizado para actuar sobre GAD65/67, inhibió totalmente la secreción a todas las concentraciones de glucosa ensayadas.

## DISCUSIÓN PARCIAL

Como vimos en el apartado anterior, el KB 5 mM reduce la actividad SSA-dh a la mitad, por lo que estaría impidiendo parcialmente la conversión del GABA celular en succínico y su posterior metabolización oxidativa en el ciclo de Krebs. Por otro lado, está también inhibiendo, aunque no en su totalidad, el paso de  $\alpha$ -cetoglutarato a fumarato mediante la inhibición de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. Y aunque también inhibe la succínico deshidrogenasa en un 30%, la inhibición mayor se ejerce sobre la  $\alpha$ -KG-dh, por lo que es este enzima el que marca el ritmo del ciclo de Krebs. Es decir, que el KB 5 mM está reduciendo en un 75% la velocidad del TCA. La SSA-dh también está inhibida, por lo que se reducen a la mitad los carbonos que entran en el ciclo de Krebs procedentes de la degradación del GABA. Pero además, como el KB 5 mM también reduce la actividad succínico deshidrogenasa en un 30%, la velocidad de metabolización del GABA en el ciclo de Krebs está significativamente reducida. Es decir, que en presencia de KB 5 mM hay una disminución del metabolismo oxidativo de la glucosa y del GABA, que se ve reflejada en una disminución del 75-85% en la secreción de insulina. También cabe destacar que la secreción de insulina que se registra en presencia de KB 5 mM y cualquiera de las concentraciones estudiadas de glucosa, es siempre la misma y, además, es mayor que la que se registra en ausencia de glucosa. Esto hace pensar en la posibilidad de que esta secreción basal y constante sea debida al propio metabolismo del KB. El KB es un intermediario del catabolismo de la treonina y de la metionina, que termina metabolizándose en el ciclo de Krebs en forma de succinil-CoA (124). Como el paso por la  $\alpha$ -KG-dh está limitado en un 75%, es posible que se esté desviando el flujo metabólico hacia la síntesis de GABA. Pero el metabolismo oxidativo del GABA en el *shunt* del GABA está también limitado porque tanto la SSA-dh, como la succ-dh están inhibidas parcialmente en presencia del propio KB. Por lo tanto, la metabolización del GABA generado está reducida en gran parte. Es posible que el SSA producido se esté reduciendo a GHB, a través de la SSA-R, que no se ve afectada por el KB, de manera que se desvían los carbonos de la entrada al ciclo de Krebs, contribuyendo así a la reducida producción de ATP y a la reducida secreción basal de

insulina que genera este cetoácido. En presencia de glucosa, el paso por la  $\alpha$ -KG-dh está igualmente reducido por el KB, por lo que el ritmo de oxidación en el ciclo de Krebs es el mismo que en ausencia de glucosa, así que la escasa producción de ATP es la misma en presencia o en ausencia de glucosa.

El mercaptopropiónico tiene, posiblemente, efectos tóxicos sobre la célula, ya que anula incluso la, ya de por sí, escasa secreción basal de insulina en islotes no estimulados. Sin embargo, la tendencia que tiene la L-alilglicina a aumentar la secreción, que se aprecia en islotes estimulados con glucosa 20 mM, podría ser reflejo del efecto específico sobre el enzima GAD65/67. Si se inhibe la formación de GABA a partir de glutamato, se está aumentando, por un lado, el glutamato disponible para que la glutamato deshidrogenasa lo reduzca a  $\alpha$ -cetoglutarato, y así contribuir a la formación de ATP. Y por otro lado, se está disminuyendo la cantidad de GABA que podría estar utilizando ATP para incluirse en las SLMVs, de manera, que dejaría de consumir ATP, que quedaría disponible para contribuir a la secreción de los gránulos de insulina.

Por lo tanto, si bloquear un enzima del *shunt* del GABA afecta a la secreción de insulina estimulada por glucosa, es posible que la glucosa esté participando en el metabolismo del GABA. Se ha descrito que la GDH trabaja, realmente, 8 veces más en el sentido de aminación que en el sentido de desaminación (20). Y es posible que cuando se exponen los islotes a concentraciones saturantes de glucosa, se estén dando las condiciones propicias para que parte del  $\alpha$ -cetoglutarato formado a partir de la glucosa, se transforme en glutamato. Y este glutamato, posteriormente, se transformaría en GABA. En este caso, la formación de GABA a partir de glucosa estaría desviando carbonos del ciclo de Krebs y, además, generando un metabolito que gasta ATP para incluirse en las SLMVs. En presencia de KB, que inhibe parcialmente la  $\alpha$ -KG-dh, se estaría favoreciendo la acumulación de  $\alpha$ -KG. Estas condiciones serían propicias para que la GDH aminase el  $\alpha$ -KG a glutamato, que posteriormente se descarboxilaría a GABA. Pero como el KB también reduce la actividad de la SSA-dh y de la succ-dh, tampoco se estaría favoreciendo la oxidación del GABA. En estas condiciones, es posible que exista un aumento de los carbonos que se metabolizan a GHB, que es el producto de reacción de la SSA-R, que metabolizaría el semialdehído succínico que no se estuviese oxidando por la SSA-dh.

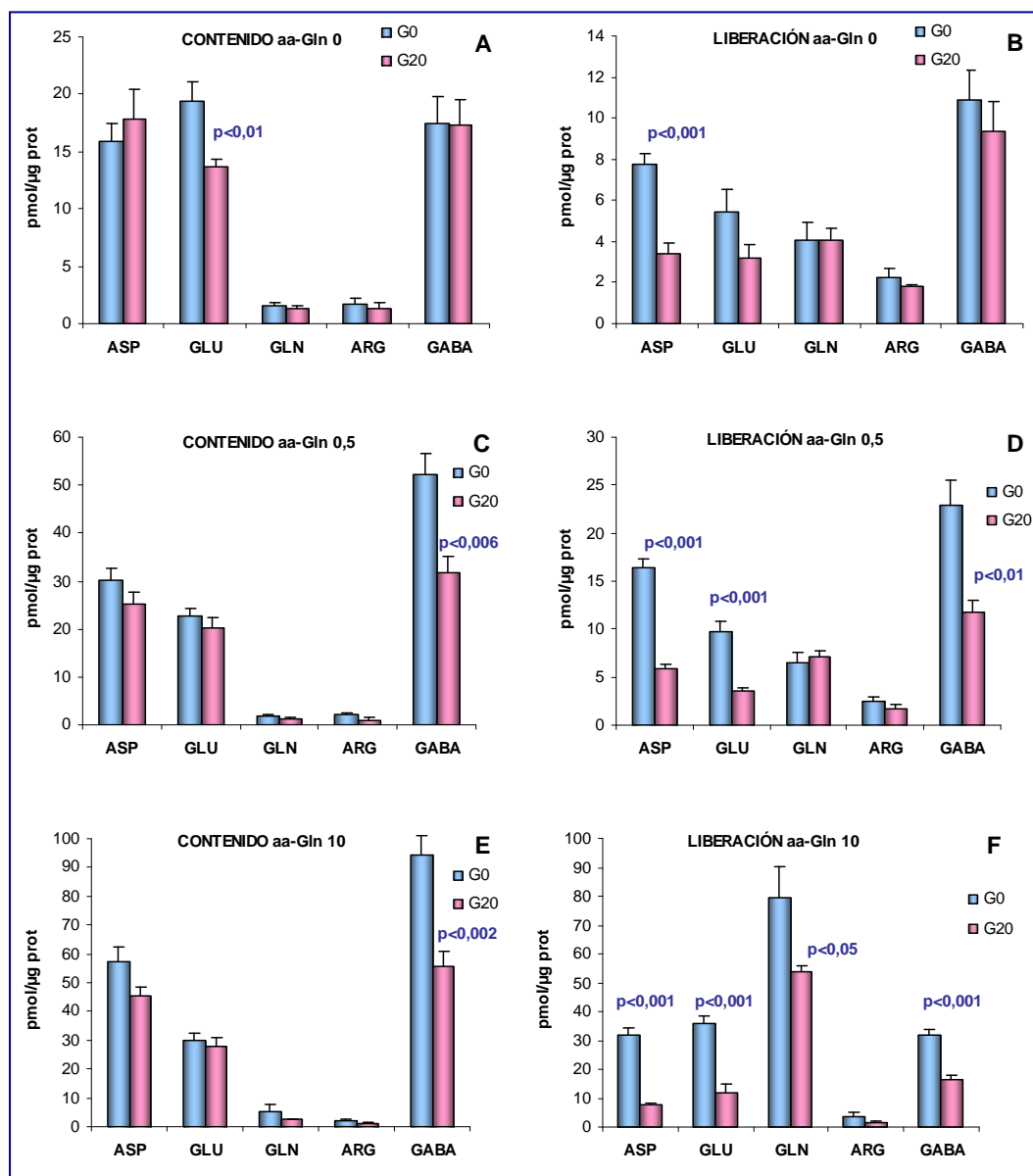
### **C.- CONTENIDO Y SECRECIÓN DE AMINOÁCIDOS EN PRESENCIA DE GLUCOSA Y GLUTAMINA**

Una vez analizado el efecto negativo del GABA sobre la secreción de insulina, quisimos comprobar cómo variaban tanto el GABA, como determinados aminoácidos relacionados (glutamato, glutamina o aspártico) en presencia de diferentes concentraciones de glutamina, que es el aminoácido precursor del GABA.

Valoramos el contenido de estos aminoácidos tras incubar 30 islotes durante 1 hora en 70  $\mu$ l de Krebs-Ringer-bicarbonato, en presencia de glutamina 0, 0.5 mM y 10 mM. Tras esa hora de incubación, se retiró el medio y se lavaron los islotes para eliminar la glutamina. Posteriormente, se incubaron de nuevo con Krebs-Ringer-bicarbonato con o sin glucosa 20 mM, pero sin glutamina. Este medio de incubación fue en el que se valoraron los aminoácidos tras derivar con o-ftaladialdehído. Para valorar el contenido, se extrajeron los aminoácidos de los islotes con sulfosalicílico al 35% y posteriormente se derivatizó y midió, cada una de las muestras, por HPLC (figura 46).

El contenido de glutamina no varió en ninguna de las condiciones ensayadas, manteniéndose alrededor de 2 pmoles/ $\mu$ g proteína. Sin embargo, la liberación fue aumentando con la glutamina exógena y, en el caso de la exposición a 10 mM, que supone saturar la célula con este aminoácido, la incubación con glucosa 20 mM hace disminuir la liberación en un 30% ( $79.5 \pm 10.9$ ,  $n=8$  vs.  $54.1 \pm 2.0$ ,  $n=5$ ;  $p<0.05$ ), aunque no su contenido. Por lo tanto, si su contenido no varía, pero sí disminuye la liberación, podemos asumir que, en presencia de glucosa 20 mM, hay una metabolización de la glutamina.

El contenido de aspartato, que es un aminoácido derivado, en último termino, de la glutamina (125), también aumenta con la exposición a concentraciones crecientes de glutamina, aunque no hay diferencias significativas entre la incubación con o sin glucosa 20 mM (figura 46A, 46C, 46E). Sin embargo, la liberación, aunque sí es mayor cuanto mayor es la concentración de glutamina a la que se expusieron los islotes, se ve afectada negativamente por la incubación con glucosa 20 mM, disminuyendo entre un 25% y un 45%.



**Figura 46: Contenido y liberación de aminoácidos en presencia de glucosa y glutamina.**

Grupos de 30 islotes fueron expuestos por triplicado, durante 1 hora, a cada condición. Se valoraron tanto contenido (A, C y E) como liberación (B, D y F) de aminoácidos en ausencia o presencia de glucosa 20 mM, frente a tres concentraciones distintas de glutamina: 0 mM (A y B), 0.5 mM (C y D) o 10 mM (E y F). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6-8 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (Asp: ácido aspártico, Glu: ácido glutámico, Gln: glutamina; Arg: arginina; GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico)

Además, la glutamina, dentro de la célula  $\beta$ , puede convertirse en glutamato, y este en  $\alpha$ -cetoglutarato (por la acción de la GDH) o en GABA (por la acción de la GAD65/67). Si nos fijamos en el glutamato, se puede apreciar que, al aumentar la concentración de glutamina 10 veces (de 0 mM a 10 mM) y en ausencia de glucosa, el contenido de éste aumenta 1.53 veces ( $19.4 \pm 1.7$ ,  $n=8$  vs.  $29.7 \pm 2.6$ ,  $n=8$ ;  $p<0.01$ ). En presencia de glucosa 20 mM, el contenido de glutamato aumenta 2 veces ( $13.6 \pm 0.7$ ,  $n=6$  vs.  $27.8 \pm 3.0$ ,  $n=5$ ;  $p<0.001$ ). La liberación de glutamato, en ausencia de glucosa, aumenta 6.6 veces con la exposición a glutamina 10 mM. Sin embargo, cuando se exponen los islotes a glucosa 20 mM, la liberación de glutamato disminuye, respecto a la condición basal, entre un 30 y un 60%.

Es decir, que la glutamina que entra en la célula, y que no es liberada, se metaboliza, en parte, a glutamato, ya que el contenido de glutamato aumenta con la exposición a glutamina. Además, el glutamato generado también es liberado de los islotes pancreáticos, pero cuando se incuban con glucosa 20 mM, el glutamato liberado es menor. Y como el contenido no se ve alterado por la presencia de glucosa, se puede asumir que, también el glutamato, es metabolizado en el islote.

El siguiente paso del glutamato, dentro de la célula, puede ser la formación de GABA y, de hecho, el contenido de GABA aumenta según aumenta la concentración de glutamina exógena. En realidad, el GABA es el aminoácido que mayor aumento experimenta dentro del islote, en condiciones basales, cuando se expone a concentraciones crecientes de glutamina. Si comparamos el contenido de GABA en ausencia de glutamina con el contenido tras la exposición a glutamina 10 mM, el incremento es de 5.4 veces ( $17.5 \pm 2.3$ ,  $n=8$  vs.  $94.4 \pm 6.8$ ,  $n=8$ ;  $p<0.001$ ). Paralelamente, su liberación también aumenta, aunque a menor ritmo, ya que tan sólo aumenta 2.9 veces. Lo que diferencia el comportamiento del GABA dentro del islote del de otros aminoácidos, es que la presencia de glucosa 20 mM hace que disminuya su contenido en un 40% cuando se expone a 0.5 y a 10 mM de glutamina, además de que su liberación también se ve afectada en un 50%. Por lo tanto, en presencia de glucosa 20 mM, tanto el contenido, como la liberación de GABA disminuyen. Y si disminuye el contenido, pero no aumenta su liberación es porque el GABA, en presencia de glucosa 20 mM, se debe estar metabolizando en la célula de forma activa.



## DISCUSIÓN PARCIAL

Cuando los islotes se exponen a concentraciones crecientes de glutamina, ésta entra en la célula, para ser posteriormente liberada al exterior del islote pancreático de una manera dosis dependiente. En condiciones basales, de no estimulación de los islotes (G0), al aumentar 10 veces la concentración exterior de glutamina, se genera un aumento del contenido de glutamato (1.5 veces), aspartato (3.6 veces) y, especialmente, de GABA (5.4 veces). Es decir, que la glutamina, principalmente, se metaboliza en GABA una vez que ha entrado en el islote. Sin embargo, cuando los islotes se incuban en presencia de glucosa 20 mM, los únicos aminoácidos que ven disminuido su contenido son el GABA (60% respecto a la condición basal) y el glutamato (75% respecto a glucosa 0 mM), en ausencia de glutamina. El contenido del resto de los aminoácidos se mantiene intacto.

La liberación de todos los aminoácidos es también proporcional a la concentración de glutamina a la que fueron expuestos. Sin embargo, cuando se incubaron en presencia de glucosa 20 mM, la liberación de todos ellos, incluido el GABA, se vio afectada negativamente. Es decir, que en presencia de glucosa 20 mM el metabolismo de la glutamina, y de los aminoácidos que de ella derivan, se ve incrementado, aunque de manera distinta. La glutamina que entra se metaboliza tanto en presencia, como en ausencia de glucosa 20 mM, en glutamato, a través de la glutaminasa mitocondrial (126). Y este glutamato, a través de GAD65 se descarboxila, preferentemente, a GABA, que puede ser incluido en vesículas (SLMV) para ser posteriormente liberado (70). Además, también puede transaminarse con el oxalacetato presente en la célula, de manera que se generan aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato. Pero el hecho de que preferentemente se metabolice a GABA, es una posible explicación del hecho de que la glutamina, por sí sola, no sea secretagoga (20, 97). Y es que no produce un incremento suficiente del  $\alpha$ -KG celular que sea capaz de generar el ATP necesario para desencadenar la exocitosis de los gránulos de insulina. La presencia de leucina favorecería la producción de  $\alpha$ -KG y, así, de ATP. Esta es la razón por la que la leucina potencia la secreción de glutamina (20, 85, 89). Sin embargo, el KIC, aportaría  $\alpha$ -KG suficiente, y al inhibir la  $\alpha$ -KGdh y la SSA-R, favorecería el flujo por el *shunt* del GABA hasta succínico.

La liberación tanto del glutamato como del aspartato, se ve afectada por la incubación con glucosa 20 mM, pero el islote mantiene constante el contenido de ambos aminoácidos. Debido a la gran producción de GABA a partir de la glutamina exógena, es

posible que gran parte del glutamato se esté metabolizando preferentemente a GABA, a expensas de consumir el glutamato en el proceso. Por eso, cuando la glutamina exógena es cero y la glucosa aumenta, el glutamato disminuye, porque está siendo usado para mantener los niveles de GABA. Como el aporte de glutamina es nulo, es el glutamato el que disminuye para mantener los niveles.

Cuando los islotes se incuban con glucosa 20 mM, además de la liberación, también se ve afectado el contenido de GABA del islote. Es decir, que la glucosa estaría promoviendo su catabolización en el *shunt* del GABA. Cuando se expone la célula a glutamina 0.5 mM, que sería una concentración fisiológica alcanzada en el plasma sanguíneo, se está aumentando en un 300% el contenido de GABA (figura 46C). Pero cuando se incuban los islotes con glucosa 20 mM, el contenido de GABA disminuye un 40%, al igual que su liberación, que disminuye un 50%. Es decir, que ya a concentraciones fisiológicas de glutamina, la glucosa es capaz de potenciar el metabolismo del GABA dentro de la célula, y es que se ha descrito que la glucosa es capaz de potenciar la actividad de la GABA-T (84). Sin embargo, en ausencia de glutamina, la glucosa no ejerce ningún efecto sobre el GABA, aunque sí está haciendo que disminuya el contenido de glutamato (figura 46A), quizás a expensas de mantener los niveles de GABA de la célula. Se desprende de estos datos, que existe un umbral de GABA para que la glucosa pueda activar su metabolismo. Cuando el aporte de glutamina exógena es nulo, la síntesis de GABA se llevaría a cabo a expensas del glutamato, y los niveles obtenidos no serían suficientes como para que la glucosa promoviese su catabolismo. Pero cuando la glutamina actúa como precursor del glutamato, su contenido se mantiene y se genera suficiente GABA como para que la glucosa promueva su degradación. Es posible que la glucosa, esté promoviendo también la síntesis de GABA, ya que cuando el  $\alpha$ -cetoglutarato aumenta en el ciclo de Krebs tras la entrada de glucosa (en una concentración saturante como 20 mM), puede transformarse en glutamato a través de la GDH (20). En estas condiciones, el  $\alpha$ -cetoglutarato superaría un determinado umbral, y éste sentido de reacción, el de aminación, sería el que tendría lugar. De esta manera, la glucosa sería precursora de la síntesis de GABA, y en presencia de glutamina exógena, podría además promover su degradación en el *shunt* del GABA.

#### **D.- LOCALIZACIÓN DEL GABA Y DE LOS ENZIMAS RELACIONADOS CON EL GABA DENTRO DEL ISLOTE**

Para determinar la localización subcelular del GABA dentro del islote, si está o no incluido en vesículas, llevamos a cabo una serie de experimentos basados en la inhibición de la liberación de aminoácidos tanto vesicular, como por transportadores, desde las células del islote. Como factores que pueden afectar esta liberación se usaron:

- la temperatura, para comprobar si una inhibición del metabolismo celular puede afectar al transporte a través de la membrana de los aminoácidos estudiados.
- la latrotoxina es una toxina que se encuentra en el veneno de la araña *viuda negra*. En rango picomolar, estimula la exocitosis vesicular por un mecanismo, recientemente descubierto, que se basa en la estimulación de los canales de potasio dependientes de voltaje y de los canales de calcio de tipo L a través de la fosfolipasa C. Posteriormente, también es capaz de formar, en la membrana de las células, un poro por el que entra calcio de forma masiva a la célula (127). De esta manera, se desencadena la secreción de los gránulos y vesículas cebados, pero en dos fases distintas. Una rápida, que corresponde a los gránulos del grupo RRP, y otra lenta, que corresponde a los del grupo de reserva (128).
- eliminando el calcio extracelular, a través de la retirada del ión del medio de incubación y de la adición de EGTA, como quelante del posible calcio residual. De esta manera se está inhibiendo la exocitosis vesicular medida por calcio.

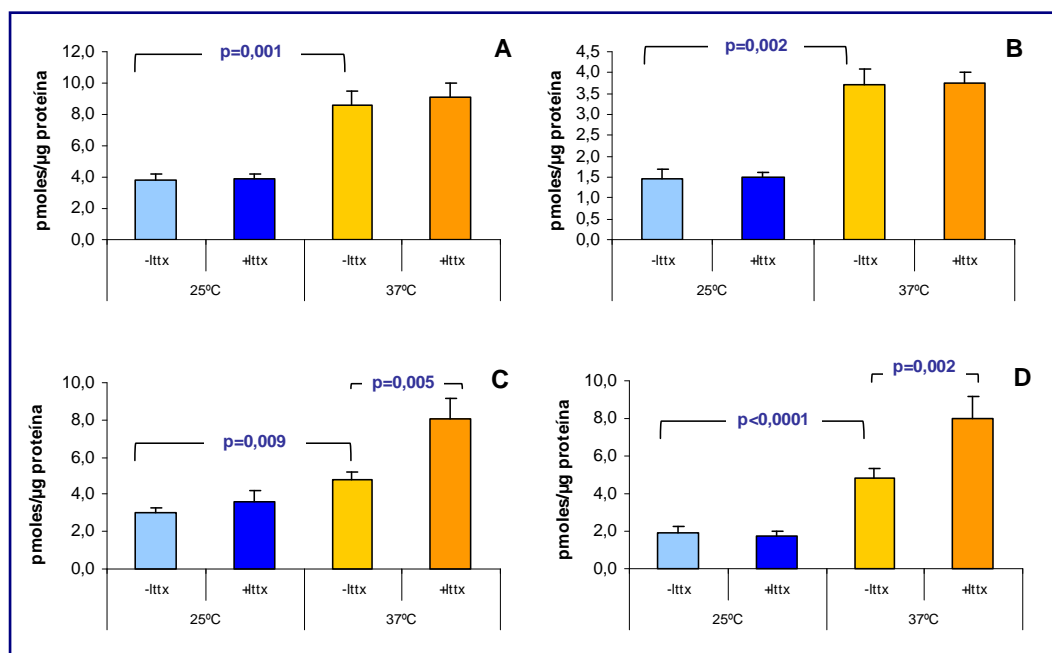
Estudiamos también la presencia de dos enzimas del *shunt* del GABA, el GAD 65/67 y el VIAAT. Usamos anticuerpos disponibles en el mercado para la detección de ambos mediante Western Blotting. Pero además, también usamos un anticuerpo donado por el doctor Bruno Gasnier frente a VIAAT (105, 106). Además, el transportador VIAAT fue inmuno-localizado por histoquímica, en colaboración con la doctora Marital Toledo Lobo, del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

## D1.- LOCALIZACIÓN VESICULAR DEL GABA.

### 1. EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y LA LATROTOXINA.

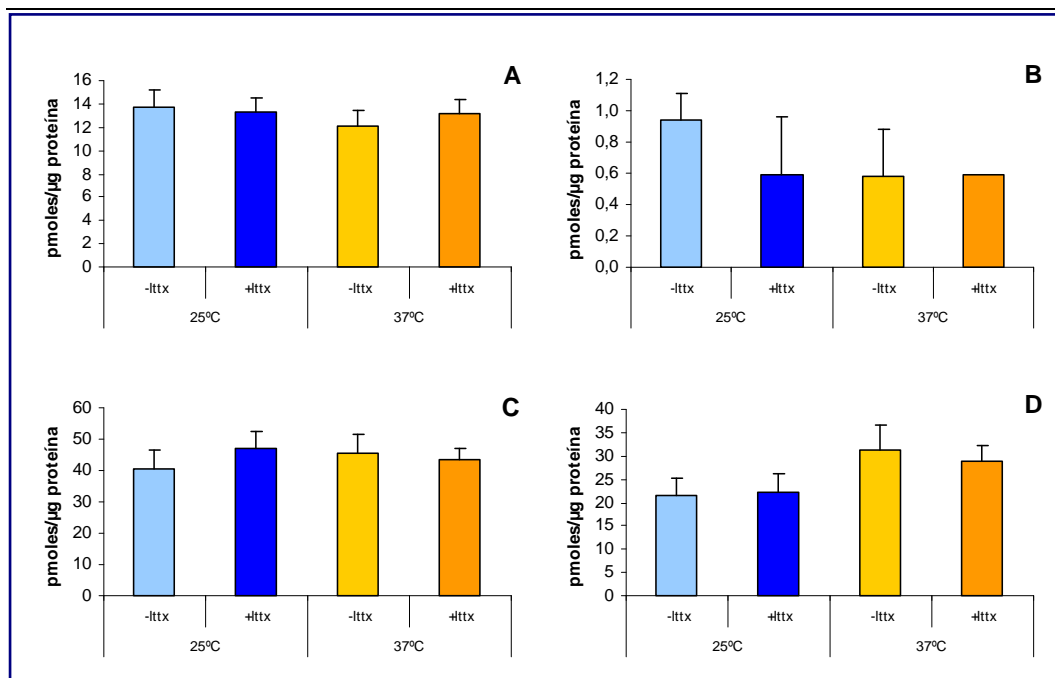
Se incubaron, por triplicado, grupos de 30 islotes, durante 1 hora, a dos temperaturas distintas (25°C y 37°C) y en presencia o en ausencia de latrotoxina 1 nM. La incubación a diferentes temperaturas nos ayudará a diferenciar la liberación de aminoácidos a través de transportadores de membrana, de la vesicular. Y la incubación con latrotoxina 1 nM nos ayudará a diferenciar los aminoácidos que se liberan por un

mecanismo de exocitosis dependiente de calcio y, por lo tanto, incluidos en vesículas, de los aminoácidos que no se incluyen en vesículas.



**Figura 47: Liberación de aminoácidos en presencia de glucosa 5 mM y en ausencia de glutamina.** Grupos de 30 islotes fueron expuestos por triplicado, durante 1 hora, a cada condición: 37°C ó 25°C, en ausencia o en presencia de latrotoxina 1 nM (ltx). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (A: liberación de glutamato; B: liberación de glutamina; C: liberación de taurina; D: liberación de GABA).

En la figura 47 se puede apreciar la diferencia que hay entre los aminoácidos glutamato y glutamina (figura 47 A y B) frente a los aminoácidos taurina y GABA (figuras 47C y 47D). Mientras que, durante la incubación a 37°C, la liberación de glutamato y glutamina no se ve afectada por la presencia de latrotoxina 1 nM (la liberación de aspartato tampoco se ve afectada por esta toxina. Datos no mostrados), la liberación de taurina y GABA se ve aumentada, en un 50%, por la presencia de latrotoxina 1 nM. Durante la incubación a 25°C no se aprecia ningún efecto por la presencia o ausencia de latrotoxina 1 nM, lo cual es normal, ya que la latrotoxina activa la entrada de calcio dentro de la célula, pero necesita que la maquinaria celular esté activa para tener algún efecto sobre la exocitosis, y esto, a 25°C, no es posible.



**Figura 48: Contenido de aminoácidos en presencia de glucosa 5 mM y en ausencia de glutamina.** Grupos de 30 islotes fueron expuestos por triplicado, durante 1 hora, a cada condición: 37°C ó 25°C, en ausencia o en presencia de latrotoxina 1 nM (ltx). Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (**A**: contenido de glutamato; **B**: contenido de glutamina; **C**: contenido de taurina; **D**: contenido de GABA).

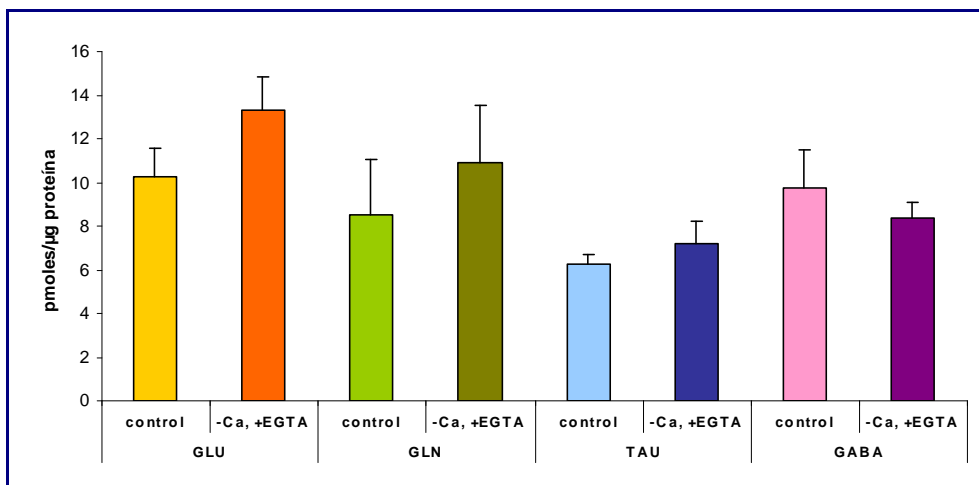
Cuando se valora el efecto de la temperatura sobre la liberación de aminoácidos, en ausencia de latrotoxina, se puede apreciar claramente que, en todos los aminoácidos estudiados, existe un aumento de su liberación (la liberación es 2.25 veces mayor a 37°C para todos los aminoácidos, a excepción de la liberación de taurina, que tan sólo aumenta 1.6 veces).

El contenido no se ve afectado ni por la temperatura ni por la presencia de latrotoxina 1 nM, para ninguno de los aminoácidos (figura 48).

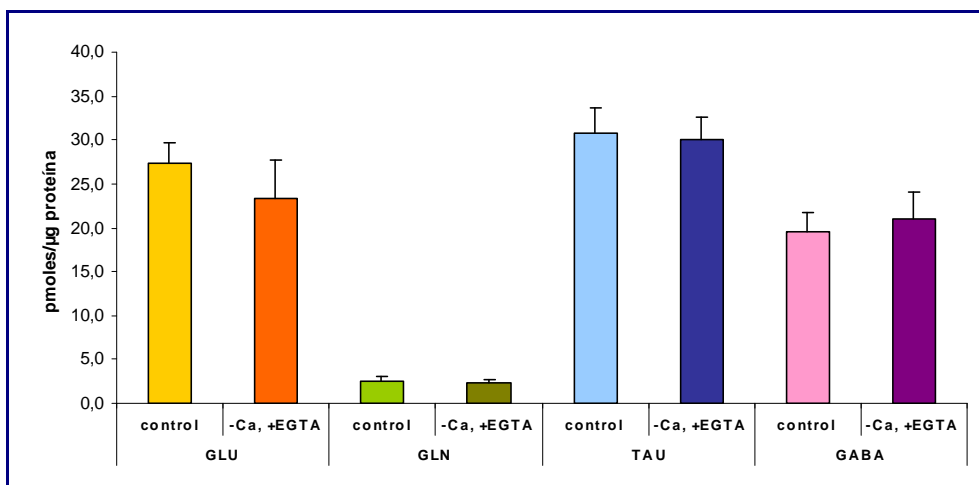
## 2.- EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DEL CALCIO EXTRACELULAR

Para eliminar el calcio extracelular se sigue una estrategia que combina dos factores. Por un lado, se elimina el calcio del Krebs-Ringer bicarbonato en el que se incuban los islotes. Y por otro lado, se añade EGTA al medio de cultivo para quelar el calcio residual. Al eliminar el calcio del medio estamos impidiendo que se desencadene cualquier exocitosis de vesículas mediada por la entrada de este ión.

La eliminación del calcio del medio de incubación no tiene ningún efecto sobre la liberación de ninguno de los aminoácidos estudiados (figura 49). De igual manera, el contenido de los mismos tampoco se ve afectado (figura 50).



**Figura 49: Liberación de aminoácidos en presencia de glucosa 5 mM y en ausencia de glutamina.** Grupos de 30 islotes fueron expuestos por triplicado, durante 1 hora, a 37°C, a glucosa 5 mM, en ausencia o presencia de calcio. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (**GLU**: glutamato; **GLN**: glutamina; **TAU**: taurina; **GABA**: GABA)



**Figura 50: Liberación de aminoácidos en presencia de glucosa 5 mM y en ausencia de glutamina.** Grupos de 30 islotes fueron expuestos por triplicado, durante 1 hora, a 37°C, a glucosa 5 mM, en ausencia o presencia de calcio. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (**GLU**: glutamato; **GLN**: glutamina; **TAU**: taurina; **GABA**: GABA)

## DISCUSIÓN PARCIAL

La incubación a dos temperaturas diferentes nos da una idea de la liberación de aminoácidos que es dependiente de transportadores de la membrana plasmática. Y aunque el contenido de aminoácidos no se ve afectado por el aumento de temperatura (figura 48), la liberación sí que aumenta para los 4 aminoácidos estudiados (figura 47). Por lo tanto, se puede asumir que estos 4 aminoácidos presentan transportadores de membrana que favorecen su liberación al exterior cuando la temperatura es fisiológica (37°C). Si el contenido no varía, pero está aumentando la liberación, es porque, en presencia de glucosa 5 mM (condiciones basales de glucemia) y a 37°C, se activa la síntesis de estos compuestos, que son inmediatamente transportados al exterior celular. Como esta liberación basal, a 37°C, no se ve afectada por la retirada del calcio del medio de incubación (figura 48), no es una exocitosis mediada por calcio, sino que es una liberación a través de transportadores de membrana, que son dependientes del metabolismo celular, ya que a 25°C no están activos.

Si la exposición a latrotoxina (figura 47) genera un aumento de la liberación de taurina y GABA, pero no de glutamato y glutamina, es porque estos dos aminoácidos están incluidos en vesículas que son exocitadas por un mecanismo dependiente de calcio, mientras que ni el glutamato ni la glutamina están incluidas en estas vesículas, y tan sólo se liberan a través de transportadores de membrana. Por lo tanto, mientras que los cuatro aminoácidos estudiados se liberan por transportadores de membrana, tan sólo la taurina y el GABA son además liberados por un mecanismo exocitótico dependiente de calcio. Pero el GABA es el aminoácido que mayor transporte a través de la membrana experimenta, ya que el incremento en la liberación es del 256%, seguido muy de cerca por la glutamina (252%) y el glutamato (229%). El aminoácido que menor transporte por la membrana experimenta es la taurina (158%). Sin embargo, la liberación que taurina y GABA experimentan en presencia de latrotoxina (por exocitosis dependiente de calcio) supone un aumento de un 169% y un 165%, respectivamente. La glicina, también experimenta un incremento en su liberación del 133% ( $18.7 \pm 1.3$ ,  $n=6$  vs.  $24.8 \pm 1.9$ ,  $n=6$ ;  $p<0.03$ ) en presencia de latrotoxina, aunque no existe diferencias cuando se someten los islotes a diferentes temperaturas ( $19.9 \pm 9.6$ ,  $n=6$  vs.  $18.7 \pm 1.3$ ,  $n=6$ ; ns), lo que descartaría un transporte a través de transportadores de membrana.

Mientras que el glutamato o la glutamina tan sólo salen de la célula a través de transportadores de membrana, la taurina se libera de forma muy similar tanto por

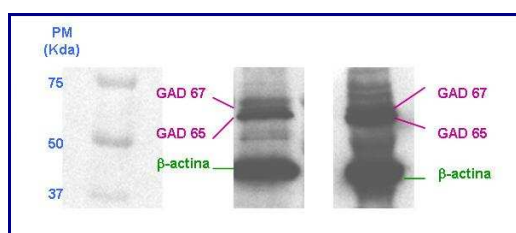
transporte a través de la membrana (48%), como por exocitosis vesicular dependiente de calcio (52%). Sin embargo, el GABA, que también se libera por ambas vías, es primordialmente liberado por transportadores de membrana. Es decir, que de todo el GABA liberado, el 60% sale mediante transportadores y tan sólo el 40% a través de la exocitosis regulada por calcio. Otros aminoácidos, como la glicina, no se liberan a través de transportadores, sino que únicamente son liberados a través de exocitosis mediada por calcio, aunque se ha descrito que el contenido de glicina en las células  $\beta$  es escaso y que se encuentra, principalmente, en las células  $\alpha$ , donde se liberaría, por exocitosis, junto al glucagón ejerciendo una acción paracrina y autocrina (73).

## D2.- IDENTIFICACIÓN DE GAD 65/67 Y VIAAT EN EL ISLOTE PANCREÁTICO.

### 1.- IDENTIFICACIÓN POR WESTERN BLOTTING DE AMBAS PROTEÍNAS.

Se llevó a cabo una inmunodetección mediante la técnica de Western Blotting de ambos enzimas. Se exploró su presencia en lisados de islotes, usándose como referencia lisados de cerebelo. En ambos tejidos se ha demostrado ya la expresión del gen del GAD65 (apartado A2).

Las muestras se prepararon como se detalla en el apartado “Material y métodos”, de manera que los tejidos son lisados con detergentes, en presencia de agentes reductores, y tras una ultracentrifugación, son preparados para ser cargados en el gel con tampón de carga, de manera que las cantidades cargadas son unos 150 islotes y unos 40  $\mu$ g de proteína total, en el caso del cerebelo.



**Figura 51: Inmunodetección por Western Blotting de GAD 65/67 en muestras de islotes y cerebelo.** En la calle 1 se cargó el patrón de pesos moleculares de Bio-Rad. En la calle 2, el lisado celular de unos 150 islotes. En la calle 3, 40  $\mu$ g del extracto de cerebelo.

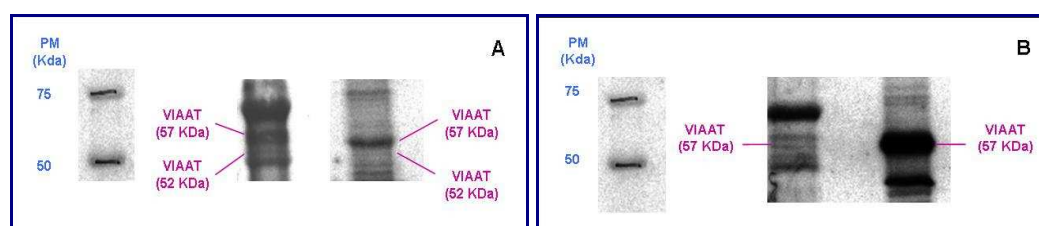
En la figura 51 se puede comprobar la presencia de ambas isoformas de GAD, tanto en islotes, como en cerebelo. En ambos casos la más expresada es la isoforma de



65 KDa (17 veces (islotes) y 2 veces (cerebelo) más que la isoforma de 67 KDa). Se evaluó también la presencia de  $\beta$ -actina, como proteína control y de referencia.

De igual manera, también se ha llevado a cabo la inmunodetección por Western Blotting de la proteína transportadora VIAAT (figura 52). Para ello se han usado dos anticuerpos distintos. Por un lado se ha usado un anticuerpo comercial, de Chemicon, que está dirigido frente a un péptido de 17 aminoácidos del extremo C-terminal de VIAAT (figura 52A). Y por otro, se ha usado un anticuerpo desarrollado y donado por el Dr. Bruno Gasnier (figura 52B). Este anticuerpo está dirigido frente a 129 aminoácidos del extremo N-terminal de la molécula VIAAT (105, 106).

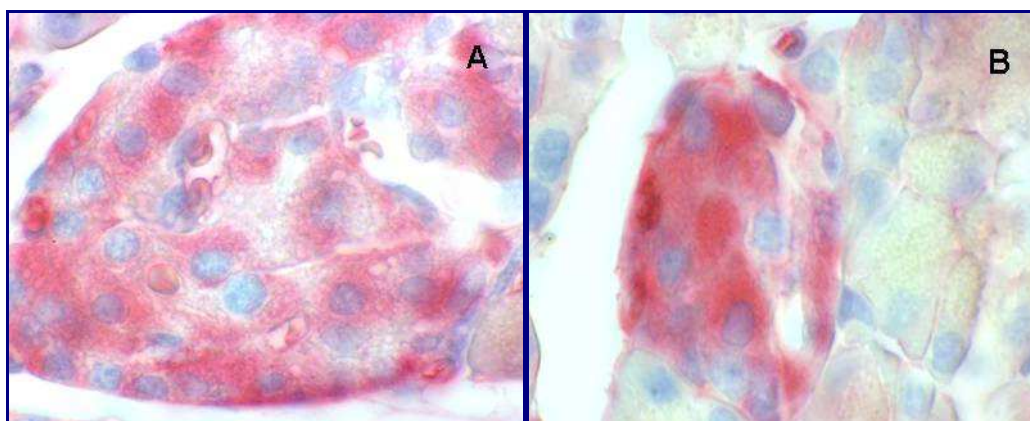
En el caso del anticuerpo de Chemicon (figura 52A), el dirigido frente al extremo C-terminal, se identifican dos isoformas, tanto en islotes pancreáticos, como en cerebelo, aunque la isoforma de 57 KDa está mucho más expresada que la de 52 KDa (1.5 veces en el caso de islotes y 32 veces en el caso de cerebelo). El anticuerpo dirigido frente al extremo N-terminal identifica la isoforma de 57 KDa en islotes pancreáticos y en cerebelo (figura 52B). En islotes pancreáticos aparece una banda con un peso molecular de 51 KDa, pero se descarta que pueda ser la isoforma de 52KDa, porque al tener el extremo N-terminal truncado no puede ser reconocida por el anticuerpo del Dr. Gasnier.



**Figura 52: Inmunodetección por Western Blotting de VIAAT en muestras de islotes y cerebelo.** En el panel A, se ha empleado el anticuerpo comercial de Chemicon. En el panel B, se ha empleado el anticuerpo donado por el Dr. B. Gasnier. En la calle 1 se cargó el patrón de pesos moleculares de Bio-Rad. En la calle 2, el lisado celular de unos 150 islotes. En la calle 3, 25  $\mu$ g del extracto de cerebelo.

## 2.- LOCALIZACIÓN DE VIAAT EN CORTES DE PÁNCREAS.

Se localizó el transportador VIAAT mediante inmunohistoquímica en cortes de páncreas incluidos en parafina.



**Figura 53: Inmunohistoquímica de VIAAT en dos cortes de páncreas.** En el panel A se puede ver un islote de Langerhans aislado, en el que se aprecia, en rojo, el transportador VIAAT. En el panel B se puede ver un islote rodeado de tejido exocrino, en el que no se detecta VIAAT.

En la figura 53 se puede identificar, en rojo, VIAAT en el islote pancreático, pero no en el tejido exocrino (figura 53B). Dentro del islote, la localización subcelular de VIAAT se restringe al citoplasma, excluyéndose del núcleo (que queda teñido en azul). En la figura 53A se puede apreciar una mayor intensidad de señal en el manto del islote respecto a la zona central.

## DISCUSIÓN PARCIAL

La presencia de GAD65/67 en el islote es aceptada desde hace varias décadas (57, 62, 68, 69). Aún así, en este trabajo, confirmamos la presencia de este enzima, que tan importante es para el desarrollo de la diabetes (IDDM). Cabe destacar la mayor presencia de GAD65, respecto a la isoforma de 67 KDa, en los dos tejidos estudiados. La isoforma de 67 KDa es la que se identificó como “soluble”, y la de 65 KDa, la asociada a las vesículas SLMVs (62, 68). Es decir, que la isoforma predominante tanto en los islotes pancreáticos, como en cerebelo es la isoforma asociada a la membrana de las vesículas de secreción. Es decir, que predominantemente el GABA es sintetizado en la proximidad de las vesículas. Se ha descrito en cerebro que la isoforma de 65 KDa está asociada a otras moléculas, entre las que se encuentra el VIAAT, lo que hace que el GABA sintetizado por GAD65 sea incluido en las vesículas a las que se asocia este enzima (68). Si extrapolamos esta afirmación al estudio de los islotes, y nos basamos sólo en los datos de expresión proteica, podríamos decir que la mayor parte (95%) del GABA sintetizado en la célula  $\beta$  (que es donde únicamente se expresa el enzima GAD65/67 (62)) se está incluyendo en vesículas con el subsiguiente gasto de ATP. El otro 5% restante se sintetizaría a través de la isoforma de 67 KDa de GAD. En cerebro

se piensa que este GABA generado por GAD67 es metabolizado en el *shunt* del GABA para producir ATP (68), por lo que es posible que lo mismo pueda ser aplicado en la célula  $\beta$ . Pero si nos fijamos en los datos de liberación y transporte de aminoácidos, es fácil percatarse de que esta explicación simplista de los resultados del Western Blotting no es la más correcta, ya que tan sólo se puede demostrar que, de todo el GABA liberado del islote, tan sólo es liberado por vía exocitótica el 40%.

La presencia de VIAAT en el islote es un tema más controvertido, ya que las publicaciones al respecto son escasas y más recientes que las publicaciones acerca de la presencia de GAD. Nosotros hemos confirmado su presencia en lisados de islotes (figura 52) y hemos sido capaces, también de detectarla por inmunohistoquímica en el islote, pero no en el tejido exocrino que lo envuelve (figura 53). Al usar dos anticuerpos distintos frente a VGAT, podremos determinar qué isoforma está presente en cada tejido. Con el anticuerpo comercial (Chemicon), que detecta el extremo C-terminal, no se puede discriminar entre la forma normal y la forma truncada. De hecho, tanto en islotes como en cerebelo se detectan las dos isoformas (figura 52A). Sin embargo, con el anticuerpo del Dr. Gasnier tan sólo se detecta la isoforma no truncada (57 KDa). Esta isoforma es la que se ha detectado en células INS1, por lo que se ha asumido que es la que se expresa en células  $\beta$ , siendo la isoforma truncada, específica de células  $\alpha$  (74).

En la inmunohistoquímica, donde se ha usado el anticuerpo comercial (Chemicon) se detecta VGAT en todo el islote, pero la intensidad de la señal es mayor en la periferia del islote, que es donde se disponen las células  $\alpha$ , donde se ha escrito que existe una mayor expresión del transportador VIAAT (70, 72, 73). En la zona central también existiría VIAAT, pero se puede apreciar que la densidad de la expresión es menor (figura 53A). En el panel B no se puede apreciar esta disposición porque el corte es superficial y tan sólo se están tiñendo las células del manto, las células  $\alpha$ . Pero, a cambio, se puede apreciar que no se expresa el transportador en el tejido exocrino.

## E.- METABOLISMO OXIDATIVO DE GLUCOSA Y GLUTAMINA

Se valoró la oxidación de la glucosa mediante la cuantificación de  $^{14}\text{CO}_2$  producido a partir de D-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glucosa, y la oxidación de glutamina mediante la cuantificación de  $^{14}\text{CO}_2$  producido a partir de L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina.

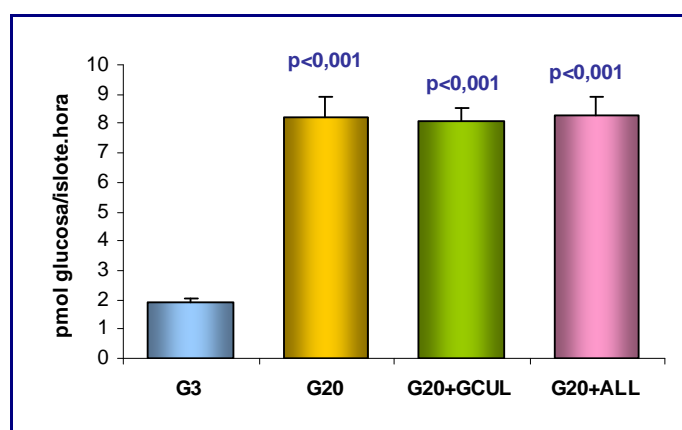
Se ensayaron dos concentraciones de glucosa, 3 y 20 mM, que son, respectivamente la concentración basal de glucosa en sangre y una concentración de

glucosa saturante. Y también se probaron dos concentraciones distintas de glutamina, 0.5 mM, que es el valor próximo al valor  $ED_{50}$  para la producción de  $^{14}CO_2$  a partir de L-[U- $^{14}C$ ]-glutamina, y 10 mM, que es el valor al que se alcanza la tasa máxima de producción de  $^{14}CO_2$  (20, 115).

## 1.- OXIDACIÓN DE GLUCOSA

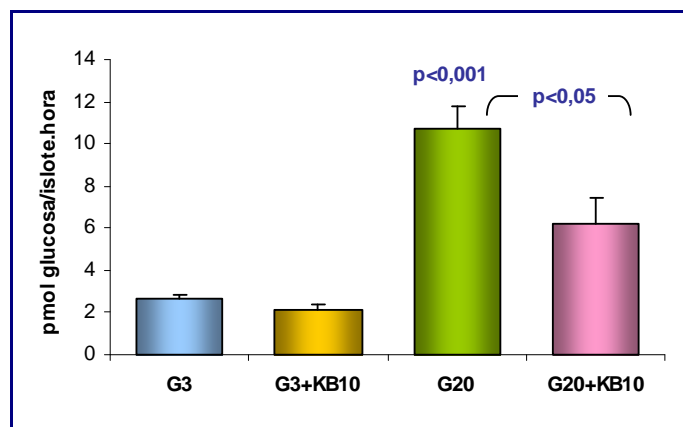
Se ha probado el efecto sobre el metabolismo del azúcar de varios inhibidores de diferentes enzimas del *shunt* del GABA. Por un lado, se ha probado el efecto del inhibidor de la GABA-T, gabaculina 250  $\mu$ M, y del precursor del inhibidor de GAD65, la L-alilglicina a una dosis de 10 mM, sobre el metabolismo de glucosa 20 mM (figura 54).

La producción de  $^{14}CO_2$  a partir de D-[U- $^{14}C$ ]-glucosa aumenta 4 veces al incrementar la concentración de glucosa desde 3 mM hasta 20 mM, lo cual indica un aumento de su metabolismo en el ciclo de Krebs. La adición de los inhibidores mencionados anteriormente no tiene ningún efecto sobre el metabolismo de la glucosa 20 mM.



**Figura 54: Efecto de gabaculina 250  $\mu$ M y de L-alilglicina 10 mM sobre la oxidación de glucosa 20 mM.** Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (GCUL: gabaculina 250  $\mu$ M; ALL: L-alilglicina 10 mM).

Por otro lado, se probó el efecto del cetobutírico 10 mM (KB) sobre el metabolismo de glucosa, tanto en condiciones basales (3 mM), como en condiciones saturantes (20 mM) (figura 55). Se ha demostrado, en apartados anteriores, que el KB es un potente inhibidor de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, que inhibe la actividad SSA-dh al 50% y la succínico deshidrogenasa, en un 25% en islotes.



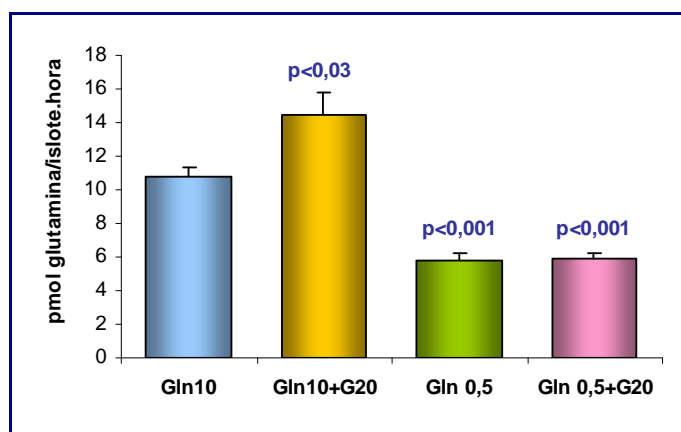
**Figura 55: Efecto de KB 10 mM sobre el metabolismo de glucosa 3 mM y glucosa 20 mM.** Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (**KB10**: cetobutírico 10 mM).

El KB 10 mM no tuvo ningún efecto sobre glucosa 3 mM, pero sí sobre glucosa 20 mM, ya que disminuyó su metabolismo en un 40%, probablemente debido al efecto inhibidor que tiene sobre los enzimas deshidrogenasa.

## 2.- OXIDACIÓN DE GLUTAMINA

### 2.1.- Efecto de la glucosa

Se ha estudiado el efecto que tenía la adición de glucosa "fría" (20 mM) sobre el metabolismo de glutamina, valorando la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de dos concentraciones de glutamina marcada radiactivamente (L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina): glutamina 0.5 mM y 10 mM (figura 56).

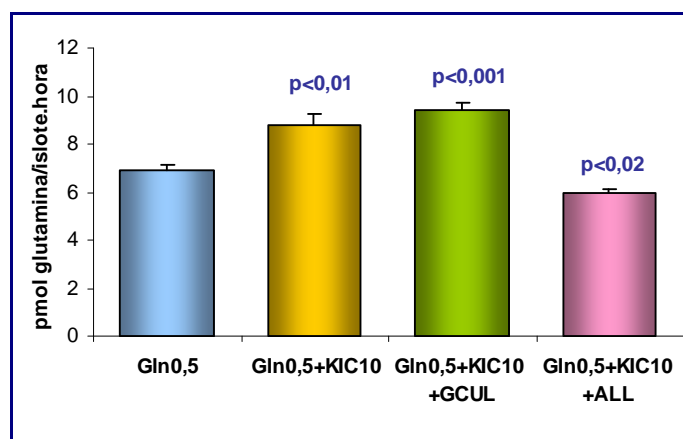


**Figura 56: Efecto de glucosa 20 mM sobre la oxidación de glutamina 0.5 y 10 mM.** Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 4 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (**Gln10**: glutamina 10 mM; **Gln 0.5**: glutamina 0.5 mM; **G20**: glucosa 20 mM).

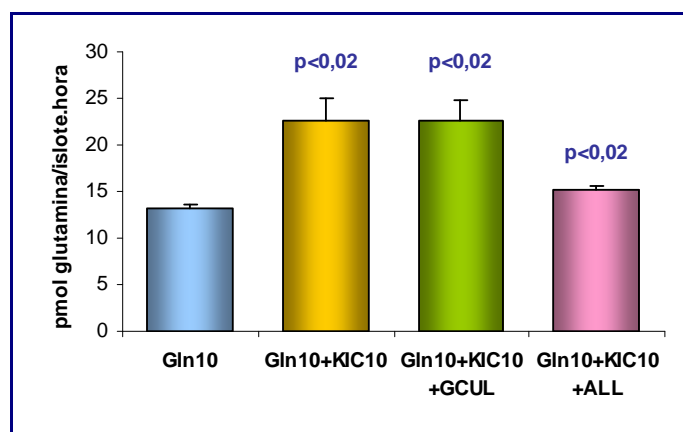
La glucosa, a una concentración saturante (20 mM), es capaz de aumentar 1.35 veces el metabolismo de la glutamina 10 mM, que también está usada a una dosis saturante. Sin embargo, no altera el metabolismo de la glutamina 0.5 mM (figura 56).

## 2.2.- Efecto de varios inhibidores del *shunt* del GABA

Al igual que en el caso de la oxidación de glucosa, también se ensayó el efecto que varios inhibidores de enzimas del *shunt* del GABA pudiesen tener sobre la oxidación de glutamina, para lo que se usaron tanto la dosis próxima al valor  $ED_{50}$  (0.5 mM) (figura 57), como la dosis saturante de glutamina (10 mM) (figura 58). Se probó el efecto de gabaculina 250  $\mu$ M y de L-alilglicina 10 mM, como en el caso de la glucosa, pero en presencia de  $\alpha$ -cetoisocaproico 10 mM (KIC), que se ha demostrado anteriormente que, en islotes, es capaz de inhibir la actividad SSA-R entre un 40 y un 75% y la actividad  $\alpha$ -KG-dh en un 80%.



**Figura 57: Efecto de KIC 10 mM, gabaculina 250  $\mu$ M y L-alilglicina 10 mM sobre la oxidación de glutamina 0.5 mM.** Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (**Gln0.5**: glutamina 0.5 mM; **KIC10**:  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM; **GCUL**: gabaculina 250  $\mu$ M; **ALL**: L-alilglicina 10 mM).



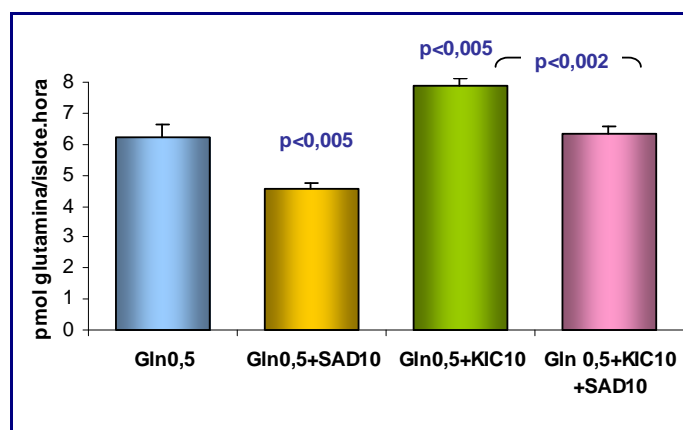
**Figura 58: Efecto de KIC 10 mM, gabaculina 250  $\mu$ M y L-alilglicina 10 mM sobre la oxidación de glutamina 10 mM.** Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 4 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (**Gln10**: glutamina 10 mM; **KIC10**:  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM; **GCUL**: gabaculina 250  $\mu$ M; **ALL**: L-alilglicina 10 mM).

Al exponerse los islotes a KIC 10 mM, el metabolismo de la glutamina 0.5 mM se incrementa 1.3 veces y el de la glutamina 10 mM se incrementa 1.7 veces. La inhibición de la GABA-T, por la acción de la gabaculina, no tiene ningún efecto sobre el metabolismo de la glutamina en presencia de KIC 10 mM, en ninguna de las dos dosis de glutamina ensayadas. Sin embargo, la inhibición de la formación de GABA a partir de glutamato, mediante la inhibición de GAD por la L-alilglicina 10 mM, sí tiene un efecto negativo sobre el metabolismo de la glutamina en presencia de KIC 10 mM, ya que lo

disminuye en un 32% tanto en el caso de la glutamina 0.5 mM ( $8.80 \pm 0.43$ ,  $n=6$  vs.  $5.95 \pm 0.17$ ,  $n=6$ ;  $p<0.001$ ), como en el caso de la glutamina 10 mM ( $22.69 \pm 2.25$ ,  $n=3$  vs.  $15.26 \pm 0.24$ ,  $n=3$ ;  $p<0.03$ ).

### 2.3.- Efecto del SAD (dimetil ester del ácido succínico)

Estudiamos el efecto del SAD 10 mM (dimetil ester del ácido succínico), que es el precursor permeable del ácido succínico, sobre el metabolismo de la glutamina a la dosis de 0.5 mM, para evitar que las vías metabólicas estuviesen saturadas.



**Figura 59: Efecto del SAD 10 mM y del KIC 10 mM sobre la oxidación de glutamina 0.5 mM.** Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 6 individuos. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student. (**Gln0.5**: glutamina 0.5 mM; **SAD10**: dimetil ester del ácido succínico 10 mM; **KIC10**:  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM).

El SAD 10 mM disminuye, aparentemente la oxidación de glutamina 0.5 mM en un 25%. Aunque el KIC, al igual que en casos anteriores, aumenta el metabolismo de la glutamina 0.5 mM en un 25%. La producción de  $^{14}\text{CO}_2$  también disminuye en un 20% respecto a glutamina 0.5 mM con KIC 10 mM, con la adición de SAD 10 mM. Pero la adición de KIC 10 mM supone un incremento en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  del 140% sobre el efecto que ya tiene el SAD 10 mM sobre la glutamina 0.5 mM ( $4.57 \pm 0.20$ ,  $n=6$  vs.  $6.33 \pm 0.25$ ,  $n=6$ ;  $p<0.001$ ) (figura 59).

## DISCUSIÓN PARCIAL

Al aumentar la concentración de D-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glucosa desde 3 mM hasta 20 mM se produce un aumento de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  del 400%, lo que refleja un aumento del



metabolismo oxidativo de la glucosa en el ciclo de Krebs. La adición de dos inhibidores del *shunt* del GABA no afecta a la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de 20 mM de glucosa (una concentración saturante del azúcar). Es decir, que aparentemente, no hay una contribución significativa de la glucosa, cuando esta es saturante, al *shunt* del GABA, ya que ni la síntesis de GABA (a partir de GAD, inhibida por L-alilglicina 10 mM) ni el catabolismo de GABA (mediante la GABA-T, inhibida por gabaculina 250  $\mu\text{M}$ ) se ven involucrados en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de D-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glucosa.

Sin embargo, la adición de KB 10 mM, que se ha demostrado que es capaz de inhibir las tres deshidrogenasas estudiadas en esta tesis, sí inhibe, en un 40% la oxidación de glucosa, cuando se administra a la dosis saturante de 20 mM. Cuando se ensaya sobre 3 mM no tiene ningún efecto, pero ya hemos comprobado anteriormente que el KB tampoco afecta negativamente a la secreción de insulina estimulada por glucosa 3 mM. El  $\alpha$ -cetobutírico inhibe la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en un 75%, la succínico deshidrogenasa en un 30% y la semialdehído succínico deshidrogenasa en un 50%. Es decir, que por un lado está afectando al ciclo de Krebs, reduciendo la actividad de la  $\alpha$ -KG-dh y de la succ-dh, y por otro, afecta al *shunt* del GABA, inhibiendo la SSA-dh. Estas inhibiciones no tienen ningún efecto cuando el islote se expone a una concentración basal de glucosa (3 mM). Sin embargo, cuando la glucosa es saturante y la maquinaria celular está funcionando al 100%, que la actividad de dos de los enzimas del ciclo de Krebs esté afectado, se refleja en una disminución del 40% en la oxidación de glucosa. Pero lo esperable es que si la  $\alpha$ -KG-dh se inhibe en un 75% por KB, la reducción en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  sea también de un 75%. Por lo tanto, es posible que parte de los  $^{14}\text{C}$  de la D-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glucosa sean desviados, en estas condiciones, hacia el *shunt* del GABA. El  $\alpha$ -cetoglutarato, que no se puede metabolizar porque la  $\alpha$ -KG-dh está inhibida en un 75%, se transamina, a través de la GABA-T, con el GABA, de manera que se genera semialdehído succínico y glutamato. El glutamato se puede volver a descarboxilar a GABA a través del GAD y el SSA puede reducirse a GHB a través de la SSA-R o puede oxidarse a succínico a través de la SSA-dh y entrar otra vez en el ciclo de Krebs, donde la succínico deshidrogenasa lo oxidaría a su vez a ácido fumárico. Pero en presencia de KB tanto la SSA-dh como la succ-dh están parcialmente inhibidas, por lo que esta última vía podría verse reducida a favor de la reducción a GHB, a través de la SSA-R. Para determinar esto, sería necesario valorar la producción de GHB (próximo apartado).

Se ha demostrado con anterioridad que la glutamina 0.5 mM y 10 mM potencia la primera fase de la secreción de insulina desencadenada por KIC 10 mM, y que la adición

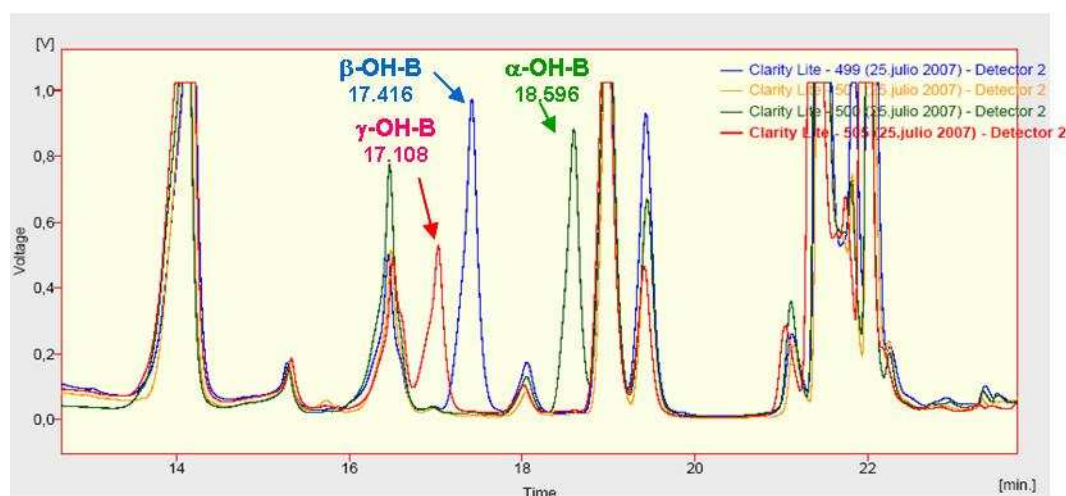
de gabaculina 250  $\mu$ M disminuye ambas fases de la secreción de insulina desencadenada por el cetoácido (115). En presencia de KIC 10 mM, la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina, tanto a la dosis de 0.5 mM, como de 10 mM, se ve incrementada, lo que coincide con el aumento de la secreción de insulina. Este aumento en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  lo que refleja es la descarboxilación que sufre el glutamato al metabolizarse en GABA y la posible oxidación metabólica que se estaría dando en el ciclo de Krebs, tras la entrada de la glutamina marcada en el mismo. Es decir, que el KIC estaría promoviendo el metabolismo de la glutamina favoreciendo su conversión en GABA y su posterior oxidación metabólica. La presencia de gabaculina, es decir, la inhibición de la GABA-T (catabolismo del GABA), no tiene ningún efecto sobre la descarboxilación de la L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina, aunque sí exista una disminución de la secreción de insulina. La gabaculina 250  $\mu$ M inhibe la velocidad de desaminación de la GABA-T en un 60%, por lo que existe una actividad catabólica residual del 40% (20, 97). Es decir, que este pequeño porcentaje puede ser suficiente para metabolizar las cantidades de GABA producidas a partir de la L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina, de manera que, aunque se reduce la actividad máxima del enzima GABA-T, la descarboxilación del glutamato (enzima GAD), que es donde se produce el  $^{14}\text{CO}_2$ , no ve afectado su ritmo de trabajo. Es decir, que la oxidación de la L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina, globalmente, no se vería afectada. La disminución de la secreción de insulina en presencia de gabaculina puede deberse a que, aunque la descarboxilación de L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina no está afectada, hay una disminución más lenta de los niveles de GABA (porque la GABA-T sí está inhibida parcialmente), por lo que puede estar consumiendo más ATP para incluirse en las vesículas y, así, afectar negativamente a la secreción hormonal. Sin embargo, la adición de L-alilglicina 10 mM, que es un potente inhibidor del enzima GAD, disminuye la oxidación de L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina en un 30%, a cualquiera de las dos concentraciones ensayadas, por lo que se puede deducir que la metabolización de glutamina en glutamato, y éste en GABA, parece ser una parte importante de la vía metabólica que sigue la glutamina para oxidarse.

El SAD disminuye aparentemente la oxidación de glutamina 0.5 mM en un 25%, pero muy probablemente sea por una dilución isotópica de los carbonos que provienen de la L-[ $^{14}\text{C}$ -U]-glutamina. Es decir, que hay una entrada de los carbonos ( $^{14}\text{C}$ ) que provienen de la glutamina en el ciclo de Krebs, y al añadir exógenamente ácido succínico en forma de su precursor permeable (SAD), se está disminuyendo la producción de  $^{14}\text{CO}_2$ , ya que aumenta la de  $\text{CO}_2$  frío. Esto confirmaría la idea de que la glutamina está entrando en el ciclo de Krebs en forma de succínico, tras su paso por el *shunt* del GABA.

Por lo tanto, la idea global que nos aportan estos resultados es que la glutamina, cuando entra en la célula, es principalmente metabolizada a GABA, el cual tiene que ser metabolizado a succínico para poder entrar en el ciclo de Krebs y contribuir así a la producción de ATP. El hecho de que el GABA pueda llegar a acumularse, tiene un efecto negativo sobre la secreción, porque supondría que fuese almacenado en las vesículas de secreción, consumiendo el ATP necesario para la secreción insulina.

## F.- FORMACIÓN DE ÁCIDO $\gamma$ -HIDROXIBUTÍRICO

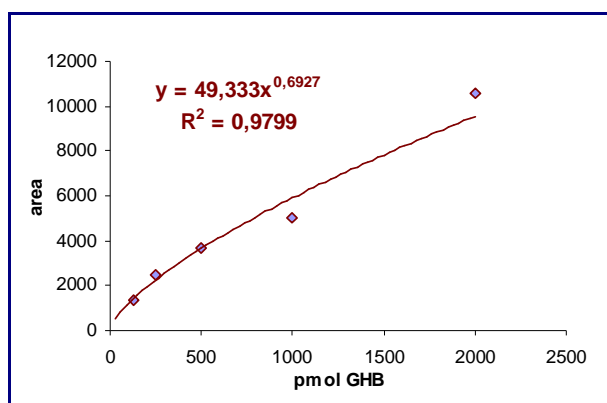
El GHB es un compuesto ampliamente estudiado en ciencias forenses, debido a su reciente uso como droga de abuso. Por esta razón las técnicas de detección y análisis, que permiten su cuantificación en muestras biológicas son abundantes en la literatura. Existen técnicas sencillas, como la detección espectrofotométrica, y otras más complejas como la detección por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Pero en ninguno de los casos la sensibilidad supera el rango nmolar (129, 130, 131, 132). De hecho, en la actualidad, aunque existen métodos que se aproximan bastante a los límites de detección requeridos (133), no existe ninguna técnica para determinar cantidades de GHB en el rango pmolar, que es el necesario para evaluar la, más que probable, producción por parte de los islotes pancreáticos.



**Figura 38: Cromatograma de elución de los tres isómeros posicionales del ácido hidroxibutírico.** El cromatograma en naranja corresponde al blanco. El rojo corresponde a 1000 pmoles de  $\gamma$ -hidroxibutírico (GHB), que eluye en el minuto 17.108 (área bajo la gráfica: 7812). El azul corresponde a 1000 pmoles del  $\beta$ -hidroxibutírico, que eluye en el minuto 17.416 (área bajo la gráfica: 12387). El verde corresponde a 1000 pmoles de  $\alpha$ -hidroxibutírico, que eluye en el minuto 18.596 (área bajo la gráfica: 10037).

Debido a esta razón, hemos desarrollado un método fluorimétrico de detección de GHB tras su separación por HPLC (ver en “Material y métodos”). El método desarrollado nos permite definir y separar los tres isómeros posicionales del ácido hidroxibutírico:  $\alpha$ -hidrohibutírico (minuto: 18.596),  $\beta$ -hidroxibutírico (minuto: 17.416) y  $\gamma$ -hidroxibutírico (minuto 17.108) (figura 60).

En la actualidad, hemos sido capaces de establecer una recta patrón que relaciona el área bajo la gráfica del pico que corresponde al minuto 17.1 frente a los pmoles de GHB introducidos en la columna de HPLC (figura 61).



**Figura 61: Ejemplo de una curva patrón para cuantificar GHB por HPLC.** Se representa el área bajo la gráfica del pico eluido en el minuto 17.12 frente a los picomoles cargados en la columna de HPLC.

La curva no se ajusta a una recta, sino a una ecuación exponencial (figura 61). Y en los experimentos preliminares, llevados a cabo hasta el momento de la publicación de esta tesis doctoral, hemos sido capaces de detectar una pequeña producción de GHB tras la incubación de 850 islotes en presencia de glucosa 5 mM, semialdehído succínico 0.5 mM (SSA) y  $\alpha$ -cetobutírico 5 mM (KB). Esta condiciones se corresponden con la situación basal de secreción de insulina (glucosa 5 mM) y con el aporte del sustrato específico para la SSA-R, SSA 0.5 mM. Además se añadió KB 5 mM para inhibir la SSA-dh, al menos, en un 50% y favorecer así la actuación de la reductasa frente a la deshidrogenasa. De esta manera, obtuvimos una producción aproximada de 60 pmol de GHB/islote.minuto. Cabe destacar que en condiciones basales de glucosa, y en ausencia de algún otro estímulo, no pudimos detectar producción alguna de GHB.

## DISCUSIÓN PARCIAL

Aunque los resultados son muy preliminares, he querido incluirlos al final de esta tesis porque son el punto de partida para nuevas investigaciones, pero también son un elemento más a favor de la existencia de un sistema GABAérgico activo en el islote pancreático. Existen determinadas condiciones en las que los islotes pancreáticos son capaces de sintetizar GHB, aunque sea en cantidades tan pequeñas como las que se han demostrado en este último apartado. De hecho, se ha demostrado en cerebro de rata que, de todo el semialdehído succínico producido por la GABA-T a partir de GABA, algo menos del 0.15% es desviado y reducido por la SSA-R hacia GHB (134). Es decir, que la producción total de GHB es muy pequeña en condiciones normales. Si a esto le sumamos la limitación del tejido de estudio (los islotes pancreáticos), se puede entender porqué la detección del GHB, con las técnicas desarrolladas hasta ahora, es prácticamente imposible. Sin embargo, si se fuerza su producción mediante la incubación de los islotes pancreáticos en determinadas condiciones estimulantes, y se miden las muestras según el método aquí desarrollado, se hace posible medir las pequeñas cantidades de GHB sintetizadas.

DISCUSIÓN

---



La presencia de un sistema GABAérgico activo y su funcionalidad en los islotes pancreáticos, y más concretamente en la célula  $\beta$ , es un tema controvertido, motivo de muchos estudios como el presente. Hay estudios a favor de un papel del GABA como transmisor de una señal negativa dentro del islote. Y hay otros estudios que valoran la posibilidad de que el GABA tenga un papel como regulador energético de la célula  $\beta$ , de manera que su metabolismo dentro de la misma podría estar regulando el aporte de energía para promover la secreción de los gránulos de insulina.

En este estudio hemos demostrado que dos enzimas característicos del *shunt* del GABA, como son la SSA-dh y la SSA-R, están presentes en los islotes pancreáticos. Ninguno de los dos enzimas había sido estudiado en islotes pancreáticos, hasta el momento. Nosotros hemos comprobado que ambos se encuentran a la par en lo que a expresión génica y actividad enzimática se refiere. A diferencia de estos, el enzima GAD ha sido ampliamente estudiado en la bibliografía. Estos estudios han permitido restringir su localización a la célula  $\beta$  (57, 58, 60, 61, 62). Igualmente, la GABA transaminasa tan sólo ha sido localizado en las células  $\beta$  del islote y no en las células  $\alpha$  o  $\delta$  (57, 62, 67). En nuestro laboratorio ya se había estudiado con anterioridad la actividad de estos dos enzimas (97, 20), caracterizando su comportamiento frente a inhibidores específicos o a determinados  $\alpha$ -cetoácidos secretagogos como el KIC. De cualquier modo, si tanto la maquinaria de producción (GAD), como la de degradación (GABA-T) del GABA, se encuentra únicamente en las células  $\beta$ , es de suponer que, igualmente, la presencia de los enzimas SSA-R y SSA-dh se restrinja también a las células  $\beta$ .

Aunque ambas actividades son del mismo orden de magnitud, cuando se mide por fluorescencia, la SSA-R es 3.5 veces menor que la deshidrogenasa. En cualquier caso, es previsible que la actividad reductasa, en condiciones fisiológicas, sea bastante más reducida que la actividad deshidrogenasa. Existe un estudio realizado en cerebro total, en el que la expresión de la semialdehído succínico deshidrogenasa es 16 veces mayor que la de la reductasa (66). Según nuestros resultados, en cerebelo, que no en cerebro total, la actividad deshidrogenasa es, tan sólo, 6 veces superior a la reductasa. De cualquier manera, la actividad SSA-dh es claramente mayor que la actividad SSA-R en tejido nervioso. Además, existe otro estudio que determina que, en cerebro de rata, el semialdehído succínico tan sólo se reduce a GHB en un 0.15% de los casos. En el resto de ocasiones, se oxida a succínico (134). Es decir, que en cerebelo, aunque el enzima SSA-R, en condiciones saturantes de sustrato, presenta una actividad del 15%, frente al



85% de la actividad SSA-dh, en condiciones fisiológicas, la reductasa sólo es la vía elegida en el 0.15% de los casos. Es decir, que la velocidad real es 100 veces menor que la velocidad máxima calculada. Si extrapolamos estos cálculos al caso de los islotes, es posible que, aunque ambas actividades son del mismo orden de magnitud, la actividad reductasa, en condiciones fisiológicas, sea 100 veces menor que la que hemos calculado. Por lo tanto, es de esperar que la actividad predominante dentro del islote sea la SSA-dh, aunque la actividad SSA-R puede ganar importancia en condiciones en las que se acumule su sustrato específico. De hecho, en los experimentos preliminares llevados a cabo para determinar la producción de GHB, tan sólo hemos sido capaces de detectar una pequeña producción en presencia de semialdehído succínico 0.5 mM y de KB 5 mM, que como hemos demostrado también en este estudio, inhibe en un 50% la actividad SSA-dh del islote.

El GHB es una sustancia que en un primer momento se usó como anestésico y como tratamiento de algunos desórdenes del sueño o el alcoholismo, y que posteriormente ha sido empleada como droga de abuso (130, 133). Pero la realidad es que el estudio de las funciones del GHB endógeno es muy reciente. La deficiencia congénita del enzima SSA-dh es la más frecuente de las enfermedades relacionadas con los neurotransmisores y se manifiesta en un amplio abanico de síntomas, que se caracterizan por un déficit en el desarrollo neuronal, que afecta, sobre todo, al lenguaje. La causa principal es la acumulación de GHB en los fluidos fisiológicos (135). Actualmente se ha desarrollado un modelo en ratón, un *knock-out* para la SSA-dh, en el que se están ensayando compuestos inhibidores de los receptores de GHB y de GABA (GABA<sub>B</sub>) (135, 136, 137). Y es que se ha demostrado que el GHB que es sintetizado en cerebro, ejerce su acción de manera directa a través de los receptores de GHB, y que también puede actuar directa o indirectamente sobre los receptores de GABA, GABA<sub>B</sub>. Por un lado, en su proceso de degradación, se convierte de nuevo en semialdehído succínico a través de una GHB deshidrogenasa (GHB-dh). El SSA puede entrar en el ciclo de Krebs como succínico, o puede transformarse de nuevo en GABA y actuar sobre los receptores GABA<sub>B</sub>. Pero también puede actuar de manera directa sobre estos receptores, aunque la cantidad necesaria para ello es elevada (138, 139, 140, 141) y la concentración endógena de GHB en cerebro puede llegar a alcanzar unos picos máximos de, tan sólo, 5 a 6  $\mu$ M (138), por lo que es difícil que activen estos receptores. Pero si se ha descrito la posibilidad de que el GHB ayude a la permanencia en la membrana de los receptores GABA<sub>B</sub>, que de otra forma, serían rápidamente

endocitados. De esta manera contribuye a potenciar el efecto del GABA sobre las células neuronales. También se ha demostrado que el GHB se incluye en vesículas, que son posteriormente liberadas en un mecanismo dependiente de calcio, mediante un transporte activo, a través de un transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (142). De hecho, se ha descrito, que en cerebro de rata, ese transportador puede ser el mismo que estaría usando el propio GABA, el VIAAT, de manera que GHB y GABA se almacenarían y se liberarían juntos (143). Por analogía con el tejido cerebral, es posible que parte del GHB sintetizado en los islotes pancreáticos sea también incluido en vesículas a través de un transportador, si no igual, al menos parecido al que usaría el propio GABA. De esta manera, podría ser liberado al exterior de la célula  $\beta$  para ejercer su acción a través de los receptores GABA<sub>B</sub> que se han encontrado en las membranas celulares de las células del islote (78, 76). Aún así, esta posibilidad es residual en comparación con el efecto del GABA, ya que la producción de GHB en los islotes es escasa en respuesta a glucosa. Aunque es posible que cuando su producción aumenta, en respuesta a determinados estímulos, pueda ganar alguna importancia esta hipótesis.

Si, como he comentado con anterioridad, los enzimas del *shunt* del GABA se encuentran, en la célula  $\beta$ , a unos niveles similares que los enzimas del ciclo de Krebs ( $\alpha$ -KG-dh y succ-dh) con los que se conectan, en cuanto a expresión génica y actividad se refiere, la GABA-T podría estar compitiendo, teóricamente, con la  $\alpha$ -KG-dh por su sustrato común, el  $\alpha$ -KG. Este  $\alpha$ -KG puede ser generado en el ciclo de Krebs tras la metabolización celular de glucosa, o bien, puede haberse generado en la reacción de transaminación catabolizada por la transaminasa de aminoácidos ramificados, que catalizaría la conversión reversible de, por ejemplo, el  $\alpha$ -cetoisocaproico (KIC) en leucina (116). Además, hemos encontrado en este trabajo que el KIC es un potente inhibidor de la  $\alpha$ -KG-dh. Se podría concluir, por tanto, de forma general, que el metabolismo de los llamados “nutrientes secretagogos” (como la glucosa o el KIC) en las células  $\beta$ , puede tener repercusiones importantes sobre el flujo metabólico en el *shunt* del GABA. Y es que una aceleración del flujo a través de este *shunt* podría conducir a una disminución de los niveles intracelulares de GABA, que según nuestros resultados, se correlaciona con una estimulación de la secreción de insulina.

Una de las primeras evidencias experimentales indirectas, obtenidas en nuestro trabajo a favor de la promoción del metabolismo del *shunt* del GABA, surgió del estudio de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de [U- $^{14}\text{C}$ ]-glutamina. El KIC estimuló

significativamente la producción del metabolito radiactivo a partir de 0.5 y 10 mM de [U-<sup>14</sup>C]-glutamina y este aumento fue parcialmente bloqueado por alilglicina, un precursor permeable de un inhibidor específico de GAD. Por este y otros motivos (publicados en (115)), la producción mayoritaria de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> es atribuible a la descarboxilación del C1 del glutamato a GABA. En presencia de glutamina extracelular debe haber suficiente disponibilidad de glutamato para las reacciones de transaminación de KIC (a leucina) y para su descarboxilación a GABA. Similarmente al KIC, la glucosa 20 mM también estimuló la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de 10 mM de [U-<sup>14</sup>C]-glutamina. Este aumento es también interpretable como un aumento de la descarboxilación de glutamato a GABA, del metabolismo de éste en su *shunt* y de su posterior entrada en el ciclo de Krebs (a nivel del succínico), donde podría sufrir nuevas descarboxilaciones de sus carbonos marcados.

La producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de D-[U-<sup>14</sup>C]-glucosa no se afecta por la adición de alilglicina. Es posible que la glucosa contribuya minoritariamente a la síntesis de GABA (vía  $\alpha$ -KG  $\rightarrow$  glutamato  $\rightarrow$  GABA + CO<sub>2</sub>) y que ésta dependa fundamentalmente de la aportación de glutamato desde glutamina plasmática. La producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de D-[U-<sup>14</sup>C]-glucosa sí se ve disminuida por el  $\alpha$ -cetobutírico (KB). Este nuevo inhibidor encontrado no actúa prioritariamente sobre un único enzima, ya que inhibe tanto la  $\alpha$ -KG-dh como la SSA-dh, lo que explica su efecto sobre la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de glucosa marcada.

Por otro lado, el uso del KB junto a otros  $\alpha$ -cetoácidos secretagogos como el KIC para la caracterización de las actividades enzimáticas estudiadas, nos ha ayudado a establecer la presencia de isoformas específicas de islote para dos de los enzimas estudiados: SSA-dh y  $\alpha$ -KG-dh. El KB 5 mM ha resultado ser un inhibidor de todos los enzimas deshidrogenasa estudiados. La actividad succínico deshidrogenasa es la que menos se ve afectada por el  $\alpha$ -cetoácido (25-30% en los tres tejidos estudiados). Sin embargo, la SSA-dh y la  $\alpha$ -KG-dh han resultado inhibirse totalmente en presencia de KB 5 mM en cerebelo e hígado. Pero en el caso de los islotes, la inhibición de ambos enzimas ha sido del 50%. Esto es lo que nos hace pensar en una isoforma específica de tejido para ambos enzimas. El KB tiene efectos drásticos sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa, ya que la reduce casi totalmente. Si están inhibidos los enzimas succ-dh y  $\alpha$ -KG-dh, la velocidad del ciclo de Krebs también está reducida (no se puede descartar que también estén inhibidos otros enzimas deshidrogenasa del ciclo de Krebs,

como la malato deshidrogenasa o la isocitrato deshidrogenasa). La oxidación de glucosa se ve reducida en un 40% en presencia de KB, pero como además, también está reducida la actividad SSA-dh, el GABA tampoco se está metabolizando hasta succínico en el *shunt* del GABA, por lo que tampoco se está favoreciendo la generación de poder reductor o de ATP.

El KIC es un cetoácido secretagogo, que es capaz de inducir las dos fases de secreción de insulina. Pero el mecanismo por el que desencadena la secreción hormonal no está del todo claro. Algunos autores apuestan por que sea su transaminación a leucina, que es un activador alostérico de la GDH, junto a la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato en esta misma reacción, lo que determine su capacidad secretora (93). Pero como la leucina, por sí sola, es incapaz de generar la segunda fase de la secreción, también se apuesta porque sea sólo la generación de  $\alpha$ -cetoglutarato, y su posterior producción de ATP, la que promueva ambas fases de la secreción (85, 94, 116). De hecho, hemos demostrado con anterioridad que la leucina resultante de la aminación del KIC en el islote, sale de la célula y no se almacena en su interior, por lo que difícilmente puede ejercer su efecto alostérico sobre la GDH (115). En esta tesis, hemos demostrado un papel adicional para el KIC, que hasta ahora no había sido propuesto. El KIC 5 mM está inhibiendo la actividad  $\alpha$ -KG-dh, por lo que el  $\alpha$ -KG generado en la transaminación del KIC, no puede ser oxidado a succínico. El  $\alpha$ -KG que no es metabolizado en el ciclo de Krebs sería entonces utilizado en la reacción catalizada por la GABA-T. De esta manera, se estaría favoreciendo la desaminación del GABA y su posterior metabolismo en el *shunt* del GABA, a expensas de la aminación del  $\alpha$ -KG a glutamato. Este glutamato podría, a su vez, ser reutilizado para la síntesis de GABA (a través de la acción de GAD) y cerrar así un ciclo, cuyo resultado sería la desaparición del GABA. Es decir, que el KIC favorece el metabolismo del GABA, de manera que la energía generada en este proceso se estaría empleando en elevar los niveles de ATP y en poner en marcha la secreción de insulina. En el caso de la glucosa (de la que no se ha demostrado ningún efecto negativo sobre la actividad  $\alpha$ -KG-dh), es posible que, efectivamente, el  $\alpha$ -KG generado no esté siendo eficazmente metabolizado en el ciclo de Krebs más allá de la  $\alpha$ -KG-dh porque la GABA-T (que es activada por la propia glucosa (84)) podría estar compitiendo con este enzima por el sustrato común. Similarmente al caso del KIC, el  $\alpha$ -KG proveniente del ciclo de Krebs “alimentaría” la reacción de la GABA-T y favorecería el metabolismo del GABA, circunvalando así el ciclo de Krebs. Este razonamiento, aplicado al KIC y a la glucosa, explica por qué estos dos nutrientes secretagogos disminuyen tan

significativamente los niveles de GABA en el islote (115). Sin embargo, en el caso de la glucosa, que a diferencia del KIC no inhibe la  $\alpha$ -KG-dh, la contribución del *shunt* del GABA a la génesis de ATP frente a la contribución del ciclo de Krebs o de la glicólisis, sería más imprevisible. Aún así, se ha descrito que en ausencia de glutamina extracelular, la célula  $\beta$  es capaz de generar GABA a partir de glucosa, de manera que se terminaría metabolizando en el *shunt* del GABA (75). Parece razonable suponer que el poder secretagogo del KIC dependería más de la promoción del metabolismo del GABA endógeno que el de la glucosa. De hecho, el KIC, cuando es transaminado a leucina, genera  $\alpha$ -KG en una reacción eminentemente anabólica. Pero no sabemos en qué grado el catabolismo del KIC hasta acetil Co-A y su posterior metabolismo oxidativo en el ciclo de Krebs, puede estar contribuyendo a la producción de ATP. De hecho, ya ha sido propuesto que la contribución del KIC a la secreción de insulina se lleva a cabo a través de la generación de  $\alpha$ -KG, pero de manera independiente de su oxidación por la  $\alpha$ -KG-dh (94), lo que estaría en consonancia con lo que hemos propuesto en estas líneas. En el caso de la glucosa, se sabe desde tiempo inmemorial que la inhibición de su catabolismo (fosforilación por la glucoquinasa, glicólisis u oxidación mitocondrial) bloquea su respuesta secretora.

El  $\alpha$ -KG, que ha sido generado por mecanismos tan dispares a partir de glucosa o a partir de KIC, además, puede servir de sustrato para la GDH. Aunque en el campo de la biología del islote se haya favorecido tradicionalmente la idea de que la GDH funcionaría *in vivo* fundamentalmente en sentido anaplerótico (desaminación de glutamato a  $\alpha$ -KG) para alimentar el ciclo de Krebs (144, 145), *in vitro* se demuestra que la velocidad de aminación del  $\alpha$ -KG es 8 veces mayor que la opuesta (20). Además, algunos autores opinan que la GDH estaría predominantemente regulada por el estado energético mitocondrial (ATP/ADP) (144, 145, 146). Esto significaría que cuando la mitocondria está metabolizando el piruvato procedente de la glicólisis o el KIC, el aumento del cociente ATP/ADP inhibiría el enzima, aunque no ha sido demostrado directamente. Por el contrario, si el enzima fuera activo *in vivo*, favorecería la conversión de  $\alpha$ -KG en glutamato, que sería descarboxilado con enorme afinidad a GABA (75, 115), retroalimentando el *shunt* del mismo nombre. Esto explicaría que la glucosa no disminuya los niveles de GABA en ausencia de glutamina, sino que sea necesaria una elevación previa (y fisiológica) de los niveles de glutamina a 1 mM o más. En contraste con la glucosa, el KIC es capaz de disminuir la concentración intracelular de GABA de manera muy significativa, aún en ausencia de glutamina (115), y el hecho de que la

transaminación de KIC a leucina (a través de la transaminasa de aminoácidos ramificados) requiera  $\text{NH}_3$ , estaría justificando que no quedaran disponibles suficientes grupos amino para la reacción de aminación de  $\alpha$ -KG a glutamato catalizada por la GDH. Por lo tanto, si no hay glutamina que aporte ese grupo amino, el GABA se estaría metabolizando a un ritmo mayor al que se estaría reponiendo, porque la GABA-T usaría el  $\alpha$ -KG generado, en transaminar el GABA, pero no se estaría reponiendo a través del GAD, ya que no habría glutamato disponible para ello. Sin embargo, en el caso de la glucosa, que a diferencia del KIC no consume grupos amino, se estaría aportando suficiente glutamato (a través de la desaminación del  $\alpha$ -KG mediante la acción de la GDH) como para mantener constantes los niveles de GABA (a través de GAD). Pero al consumir el  $\alpha$ -KG disponible en generar glutamato, disminuiría la posibilidad de que fuese usado por la GABA-T para metabolizar el GABA, ya que la glucosa también debe seguir supliendo  $\alpha$ -KG al ciclo de Krebs para generar el ATP necesario para desencadenar la secreción de insulina.

El aumento del flujo metabólico en el *shunt* del GABA promovido por glucosa y KIC puede tener dos destinos alternativos: bien se produce GHB por reducción del producto desaminado de GABA, el semialdehído succínico (a través de la SSA-R) o bien se produce ácido succínico, mediante la oxidación del SSA por la correspondiente deshidrogenasa (SSA-dh). Se ha demostrado, mediante el estudio de su expresión génica y su actividad enzimática, que ambos están presentes en el tejido insular. Sin embargo, no ha sido posible, de momento, demostrar la producción de GHB en condiciones estándar de estimulación de la secreción de insulina. En cualquier caso, el KIC tendría, sobre la glucosa, la ventaja añadida de ser capaz de inhibir (además de la  $\alpha$ -KG-dh) la SSA-R, como ha sido demostrado en los resultados. Esto supondría que el KIC favorecería la producción de succínico y su posterior oxidación en el ciclo de Krebs frente a la producción de GHB. Éste último, por analogía con el tejido cerebral, podría ser un producto final no metabolizable en el islote, que podría tener cierto papel como potenciador de la acción paracrina y autocrina del GABA. La glucosa, por el contrario, no dispone de ninguna característica que le permita una promoción preferencial del succínico *versus* GHB. De cualquier manera, la vía de la reductasa no parece ser muy activa en condiciones fisiológicas, dada la imposibilidad, apuntada anteriormente, para detectar cualquier aumento de la producción insular de GHB en presencia de glucosa o KIC, aunque los resultados son muy preliminares y el tejido con el trabajamos es bastante limitante.

Habiendo constatado que tanto la glucosa como el KIC disminuyen eficazmente los niveles intracelulares de GABA, previsiblemente, promoviendo su metabolismo, se investigó su significado funcional en el caso de la glucosa, cuyo mecanismo de estimulación de la secreción de insulina está más establecido en todos sus aspectos. Para ello, se recurrió a “pinzar” la concentración intracelular de GABA utilizando un precursor extracelular permeable a través de la membrana plasmática. Tanto el éster metílico (mGABA) como el etílico (eGABA) permearon la membrana de las células del islote y generaron un aumento de la concentración intracelular de GABA, de manera lineal con el incremento de la concentración extracelular del precursor. La linealidad de la dosis-respuesta sugiere que el precursor entra por difusión simple y que, una vez en el citoplasma, es eficazmente hidrolizado a GABA y metanol o etanol, respectivamente. La mayoría de los estudios se han realizado utilizando eGABA, aunque los dos ésteres generaron similares concentraciones intracelulares de GABA. Además se ha comprobado que el etanol no reproduce los efectos de eGABA, descartando cualquier efecto inespecífico o tóxico del precursor sobre la secreción de insulina o sobre la célula secretora.

En incubaciones estáticas, la secreción de insulina estimulada por diferentes concentraciones de glucosa (5, 7 y 20 mM) es inhibida por eGABA en forma dosis-dependiente. Hay que destacar que 1.5 mM de eGABA reproduce y “pinza” la concentración intracelular de GABA a los valores fisiológicos alcanzados a la concentración de glutamina plasmática (cerca a 1 mM). En esa circunstancia, la secreción de insulina inducida por glucosa 7 mM se inhibe en un 35%. Estudios de *patch clamp* en célula  $\beta$  aisladas, realizados en colaboración, por los Drs. P. Rorsman y M. Braun (*Oxford Center for Diabetes, Endocrinology and Metabolism*), han demostrado que el eGABA 5 mM produce una hiperpolarización significativa atribuible a un aumento de la conductancia al  $K^+$ , y que es bloqueada en presencia de tolbutamida (inhibidor específico de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP,  $K^+_{ATP}$ ). En parches de membrana aislados (tanto en orientación “inside-out”, como “outside-out”) se ha comprobado que ni el GABA, ni su precursor, el eGABA, ejercen ningún efecto directo sobre la conductancia iónica. Esto supone un importante apoyo experimental de nuestra hipótesis original que planteaba la posibilidad de que la captación de GABA por SLMVs consumiera suficiente ATP como para disminuir su concentración (localmente o en el citoplasma) y evitar así el

cierre de los canales  $K^+_{ATP}$  evitando la depolarización celular y la estimulación de la secreción de insulina.

En experimentos de perfusión se observa una secreción bifásica de insulina en respuesta a glucosa. A concentraciones elevadas (20 mM), el eGABA 5 mM no disminuye la primera fase o pico de secreción (10 minutos de duración), pero reduce la segunda fase (fase mantenida). Sin embargo, el efecto se hace patente en ambas fases cuando la concentración de glucosa es inferior (7 mM). La tolbutamida sólo recupera la primera fase de secreción, pero en ningún caso bloquea la inhibición que ejerce el eGABA sobre la segunda fase de la secreción, independientemente de la concentración de glucosa. Aparentemente, la primera fase parece depender casi exclusivamente de un cierre correcto de los canales  $K^+_{ATP}$ . La resistencia de esta primera fase de la secreción de insulina estimulada por glucosa 20 mM (G20), en contraste con 7 mM, a ser inhibida por eGABA se interpreta como resultado de una mayor producción de ATP en respuesta a la mayor concentración de glucosa. La glucosa estaría compensando el aumento del consumo energético causado por la captación vesicular de GABA. De hecho, en los experimentos de *patch-clamp* se observa que la hiperpolarización producida por eGABA 5 mM es menor, cuanto mayor es la concentración de glucosa. Apoyando esta interpretación, la bafilomicina A1, inhibidor específico de la ATPasa vesicular, bloquea parcialmente la inhibición de la secreción de insulina, así como la hiperpolarización de la membrana plasmática en presencia de eGABA.

El mecanismo final de exocitosis se ha explorado también mediante el estudio de las variaciones de la capacitancia de la membrana, en respuesta a estímulos eléctricos depolarizantes. El eGABA se ha demostrado capaz de inhibir muy significativamente los aumentos de capacitancia inducidos por los estímulos depolarizantes. Este efecto ya no depende de los canales de  $K^+_{ATP}$  y además, no es revertido por la tolbutamida. Datos preliminares del laboratorio de los Drs. P. Rorsman y M. Braun parecen indicar que el eGABA alcaliniza reversiblemente los gránulos de secreción en células  $\beta$  que expresan VAMP-phluorina en sus gránulos de secreción. La phluorina es un fluoróforo sensible a variaciones de pH, que al unirse a la proteína VAMP, de los gránulos de secreción, se convierte en un indicador del pH interno de los gránulos. El mecanismo de captación de GABA en las SLMVs, y aparentemente también en los gránulos de secreción de insulina, se produce mediante un contra-transporte de  $H^+$  al exterior, que produce la subsiguiente alcalinización parcial del lumen vesicular o granular. El gradiente de pH sería restaurado



gracias a la ATPasa vesicular, que consumiendo ATP, re-introduciría los  $H^+$ . Esta alcalinización de los gránulos sería responsable, mediante un mecanismo no conocido, de alterar el proceso de cebado de los gránulos de insulina (6, 46, 147). Sin embargo, no alteraría el proceso de maduración proteolítica de pro-insulina en insulina, ya que exposiciones agudas de islotes a eGABA no alteran su contenido en insulina.

Disponemos de evidencia experimental sólida de que el GABA, y también la taurina, se acumulan en vesículas (SLMVs o gránulos de secreción). Y es que la  $\alpha$ -latrotoxina, una neurotoxina capaz de estimular la exocitosis calcio-dependiente, aumenta muy significativamente la liberación de ambos aminoácidos. Esta liberación exocitótica coexiste, seguramente, con una salida mediada por transportadores, en el caso de los cuatro aminoácidos, ya que son muy sensibles a la variación de temperatura, lo cual es un hecho característico del transporte mediado. Esta evidencia plantea la duda razonable de la eficacia de una posible secreción exocitótica regulada (hipotéticamente) de GABA, superpuesta a una liberación basal constitutiva, relativamente elevada, mediada por transporte, sobre la regulación paracrina de glucagón en las vecinas células  $\alpha$  del islote.

En resumen, el descenso de los niveles intracelulares de GABA, en las células  $\beta$  estimuladas por glucosa, contribuiría indirectamente a la elevación de la concentración de ATP, favoreciendo así la depolarización celular. La disminución de la concentración de GABA y la consiguiente disminución de su captación vesicular “apagaría” el efecto alcalinizador sobre los gránulos de secreción y permitiría su exocitosis normal durante la segunda fase. En los experimentos de liberación de aminoácidos, en islotes precargados con concentraciones variables de glutamina, se observa que la liberación de GABA es proporcional al contenido insular. En sentido inverso, a mayor concentración intracelular de GABA, mayor contenido vesicular liberable del mismo.

Otra prueba más a favor de la inclusión del GABA en las vesículas, que apoyaría la hipótesis de un consumo de ATP que afectaría negativamente a la secreción hormonal en la célula  $\beta$ , sería la presencia del transportador VIAAT, que ha sido probada en esta tesis. Como se ha descrito en la bibliografía (70, 73, 74), hemos caracterizado la presencia de dos isoformas, una de 57 KDa y otra de 52 KDa. Esta última, la isoforma con el extremo N-terminal truncado, sería la que se encuentra en las células  $\beta$ , y sería la menos expresada dentro del islote. De hecho, en la inmunohistoquímica se puede

apreciar cómo la mayor expresión del VIAAT se da en las células de la periferia del islote, las células  $\alpha$ , que serían las que expresan la isoforma no troncada, la de 57 KDa. Además, también hemos caracterizado la expresión de las dos isoformas de GAD, siendo mayoritaria la isoforma de 65 KDa, que es la que se ha asociado, en sistema nervioso, con el complejo asociado a la membrana de las vesículas, en el que se encuentra también el transportador VIAAT (68). Por lo tanto, se hace evidente la relación entre generación de GABA e inclusión en las vesículas, con el consiguiente gasto de ATP asociado al proceso. De cualquier manera, cabe destacar el hecho de que tan sólo el 40% del GABA que sale del islote, es liberado a través de exocitosis vesicular, mientras que el 60% es liberado por transporte a través de la membrana. Es decir, que aunque la isoforma que más se expresa es la de 65KDa, la teóricamente asociada a vesículas, predomina la salida constitutiva del GABA por los transportadores de membrana. De cualquier manera, la inclusión de GABA en vesículas, o en gránulos de secreción, sería dependiente de este transportador VIAAT. La expresión de la isoforma de 52 KDa es bastante limitada, sobre todo en comparación con la de la isoforma de 57 KDa, que se localiza en células  $\alpha$ , y sobre todo, en comparación con la expresión de GAD65. Por lo tanto, es posible que no todo el GABA que se está generando pueda entrar en las vesículas, porque el transportador VIAAT esté saturado. Es posible, por tanto, que parte del GABA generado sea expulsado a través de transportadores de membrana y que otra parte sea metabolizado. También se ha propuesto que la isoforma de 67 KDa del GAD sea la encargada, al menos en cerebro, de generar GABA que posteriormente será oxidado en el *shunt* del GABA para generar ATP (68). Sin embargo, en un estudio reciente de Wang y cols. (84) se propone una función distinta para estas dos isoformas. Wang propone que mientras que la glucosa favorece la oxidación mitocondrial del GABA, por la activación de la GABA-T, el glucagón, o el GLP-1 (*glucagon-like peptide*, péptido parecido al glucagón), favorecen la salida de GABA, de manera no-dependiente de calcio. Además, han asociado este efecto con un incremento en la expresión de GAD67 (y no de GAD65), de manera dependiente del AMP cíclico (AMPC). De hecho, la inhibición de la expresión de GAD67 supone una completa supresión de la liberación del GABA. Es decir, que asociarían la expresión de GAD 67 con la formación de GABA que va a ser liberado fuera de la célula  $\beta$ , a través de transportadores, para ejercer, supuestamente, su acción paracrina sobre las células  $\alpha$  y regular así la liberación de glucagón, como ya ha sido demostrado con anterioridad. La glucosa estaría disminuyendo la liberación de GABA, al favorecer su oxidación a nivel de la GABA-T. Sin embargo, el GLP-1 podría estimular la formación de nuevo GABA, a nivel

de GAD67, liberarlo y poder mantener así la acción paracrina del mismo. En cualquier caso, ellos, al igual que nosotros, suponen que la glucosa participa tanto en la síntesis como en la oxidación del GABA dentro de la célula  $\beta$ .

En apoyo de nuestra hipótesis inicial de trabajo, en la que se asocia la presencia de GABA con una disminución de la secreción de insulina, como consecuencia del gasto de ATP derivado de su inclusión en las vesículas de secreción, hemos demostrado en este trabajo que la entrada del aminoácido en los gránulos de secreción de insulina ocurre y que lo hace generando una alcalinización del interior granular. La presencia de GABA está paralelamente asociada con una disminución de la capacitancia en las células  $\beta$  y con una hiperpolarización generada por la inhibición de los canales  $K^+_{ATP}$ . A nivel funcional, hemos asociado el “pinzamiento” de la concentración intracelular de GABA (en forma de su precursor permeable: eGABA), a niveles fisiológicos, con una disminución de ambas fases de la secreción de insulina estimulada por glucosa, distinguiéndose un primer efecto sobre la primera de las fases, provocado por la disminución de ATP, y un segundo efecto, sobre la segunda fase, probablemente relacionado con la alcalinización granular generada por la entrada del GABA.

Por otro lado, hemos demostrado que sustancias secretagogas, como la glucosa, y principalmente el KIC, están favoreciendo la oxidación del GABA en la célula  $\beta$ . Esto contribuiría a la secreción de insulina, ya que se dejaría de consumir ATP, por un lado, y se estaría generando en su oxidación mitocondrial, por el otro. De hecho, hemos identificado y caracterizado el sistema enzimático necesario para oxidar el GABA hasta succínico o, en determinadas condiciones, aún por establecer, hasta GHB. Este último, el GHB, posiblemente pueda tener una función paracrina importante, mediante una posible potenciación de la acción paracrina del propio GABA del que deriva.

CONCLUSIONES

---



Tras lo expuesto a lo largo de esta tesis, se puede concluir que:

1. La presencia de la maquinaria enzimática de formación y degradación del GABA dentro del islote pancreático de rata, confirma la idea de la existencia de un sistema GABAérgico activo en este tejido, que daría preferencia a la oxidación metabólica final del GABA en el ciclo de Krebs, al que entraría en forma de succínico, frente a la generación del metabolito GHB, potenciador, posiblemente, de la acción paracrina de su precursor, el GABA.
2. La respuesta de la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSA-dh) y de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ -KG-dh) a dos cetóácidos secretagogos, como el ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico (KIC) y el ácido  $\alpha$ -cetobutírico (KB), permite determinar la presencia de posibles isoformas específicas de islote para estos dos enzimas, ya que se comportan de manera distinta que sus homólogos cerebelares y hepáticos.
3. El contenido intracelular de GABA es disminuido significativamente por glucosa y KIC, en paralelo a la estimulación de la secreción de insulina. Sin embargo, estos dos “nutrientes secretagogos” de la secreción de insulina no modifican (en el caso de la glucosa), o incluso disminuyen (en el caso del KIC), la salida de GABA. Se concluye, por tanto, que la disminución del contenido de GABA se debe a un aumento del metabolismo del mismo.
4. Es posible que el mecanismo que desencadene la disminución del contenido intracelular de GABA se base en un aumento del flujo metabólico del mismo en su propio “*shunt*”. El flujo aumentaría como consecuencia del incremento en los niveles intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), generados en el ciclo de Krebs, a partir de glucosa, o en la transaminación de KIC a leucina, a expensas del glutamato. El  $\alpha$ -KG disponible desplazaría el equilibrio de la GABA transaminasa (GABA-T) hacia la formación de semialdehído succínico (SSA) y glutamato, generando un aumento del flujo metabólico en el “*shunt*” del GABA, donde el SSA sería oxidado hasta succínico, reingresando así en el ciclo de Krebs y haciendo disminuir el contenido de GABA.

5. La disminución del contenido intracelular de GABA, generada por glucosa, parece tener relevancia fisiológica, ya que su “pinzamiento”, con etil-GABA (eGABA) 1.5 mM, a los niveles fisiológicos obtenidos a la concentración plasmática de glutamina (su precursor metabólico), inhibe significativamente la secreción de insulina.
6. El mecanismo de esta inhibición depende de un doble efecto ejercido por los niveles, relativamente elevados, de GABA. Por un lado, se produce una hiperpolarización de la membrana plasmática, por un aumento de la conductancia al  $K^+$ , que bloquea la depolarización inducida por glucosa. Por otro lado, interfiere directamente con el propio proceso de exocitosis de los gránulos de insulina, induciendo su alcalinización. Ambos efectos son atribuibles al aumento de la captación de GABA tanto por las microvesículas de tipo sináptico, como por los gránulos de secreción. El GABA es contra-transportado con un protón ( $H^+$ ) (produciendo la alcalinización vesicular). El aumento de la actividad ATP-asa vesicular, para restaurar el pH ácido luminal, consume ATP, lo que produce que éste no aumente suficientemente como para cerrar los canales de  $K^+$  dependientes del nucleótido y se hiperpolarice la membrana plasmática.
7. El GABA se acumula en vesículas de las células  $\beta$  y de otras células insulares, como demuestra el aumento de su liberación por  $\alpha$ -latrotoxina. Esta idea se ve reforzada por la presencia de VIAAT (transportador vesicular de GABA, típico de tejido nervioso) en el islote pancreático. Por otra parte, la liberación constitutiva de GABA está linealmente relacionada con el contenido intracelular, lo que significa que a mayor concentración de GABA, mayor captación vesicular.

ANEXO 1

---





		SSA-R			SSA-dh			2-KG-dh			succ-dh	
		CONTROL	KIC 5 mM	KB 5 mM	CONTROL	KIC 5 mM	KB 5 mM	CONTROL	KIC 5 mM	KB 5 mM	CONTROL	KB 5 mM
HÍGADO	ABS	--	--	--	3,30±0,34 c	3,90±0,37 ns	0,12±0,50 p<0,001 (3,6%)	12,24±0,22 c		-0,27±0,01 p<0,001 (0,0%)	3,12±0,33 c	2,23±0,11 p<0,03 (71%)
	FL	0,23±0,10 c	0,04±0,01 p<0,05 (17%)	0,23±0,05 ns	2,44±0,37 c	2,81±0,41 ns	0,05±0,01 p<0,001 (2,1%)	4,42±0,59 c	0,36±0,18 p<0,001 (8,1%)	0,04±0,04 p<0,001 (0,8%)		
CEREBELO	ABS	2,54±0,14 c	1,06±0,13 p<0,001 (42%)	1,67±0,19 p<0,03 (66%)	15,93±0,60 c	12,79±1,23 p<0,03 (80%)	0,18±0,11 p<0,001 (1,1%)	2,70±0,24 c		-0,05±0,07 p<0,001 (0,0%)	0,56±0,06 c	0,41±0,04 ns
	FL	0,57±0,09 c	0,22±0,02 p<0,01 (38%)	0,22±0,02 p<0,01 (39%)	11,91±0,98 c	12,81±1,05 ns	0,01±0,04 p<0,003 (0,0%)	6,13±0,49 c	2,16±0,34 p<0,001 (35%)	0,10±0,05 p<0,001 (1,6%)		
ISLOTES	ABS	4,31±0,20 c	1,05±0,12 p<0,001 (24%)	3,56±0,43 ns	4,52±0,41 c	4,14±0,28 ns	4,79±0,45 ns	2,58±0,34* c		1,27±0,02* p<0,05 (49%)	1,06±0,08 c	0,73±0,08 p<0,03 (69%)
	FL	1,30±0,10 c	0,82±0,03 p<0,01 (63%)	1,11±0,11 ns	4,69±0,15 c	4,48±0,16 ns	2,36±0,19 p<0,001 (50%)	7,21±1,28 c	1,55±0,31 p<0,005 (21%)	1,84±0,23 p<0,005 (25%)		

**ANEXO1: Cuadro resumen de las valoraciones de actividad enzimática, tanto por absorbancia (ABS), como por fluorescencia (FL) para los 4 enzimas, en los 3 tejidos estudiados.** Los resultados están referidos a la cantidad de proteína de los extractos y, en el caso de las medidas por absorbancia, al coeficiente de extinción molar para el NAD(P)H ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) o para el DCPIP ( $\epsilon_{600\text{nm}} = 21 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). En el caso de las medidas por fluorescencia, los valores están referidos a la cantidad de proteína de los extractos tisulares y a las rectas patrón de NADPH o de NADH realizadas con anterioridad. Los valores se corresponden con las medias  $\pm$  S.E.M. de un grupo experimental de 4, 6 o 10 individuos, según el caso, y están expresados en  $\mu\text{moles NAD(P)H/min.mg proteína}$  o en  $\mu\text{moles DCPIP/min.mg proteína}$ . Los resultados fueron analizados estadísticamente según el método T de Student.



## BIBLIOGRAFÍA

---



1. Atkinson MA y Maclaren NK. (1993) Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 92:1608-1616
2. Elayat AA, El-Nagar MM y Tahir M. (1995). An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islet. *Journal of Anatomy*. 186:629-637
3. Tesis doctoral de Mónica George Palop. Estudio de la regeneración de páncreas endocrino en animales transgénicos: una nueva aproximación de terapia génica para diabetes tipo 1. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Noviembre 2000
4. DeFronzo, 1999; Unger, (1991). Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science*. 251(4998):1200-1205
5. DeFronzo RA (1999). Pathogenesis of type 2 diabetes, metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Reviews*. 5:177-269
6. MacDonald PE, Joseph JW and Rorsman P. (2005) Glucose-sensing mechanism in pancreatic  $\beta$ -cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science* 360;2211-2225
7. Iynedjian PB. (1993) Mammalian glucokinase and its gene. *Biochemical Journal*. 193:1-13
8. Matchinsky FM. (1996) A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45:223-241
9. Sener A, Kawazu S, Hutton JC, Boschero AC, Devis G, Somers G, Herchuelz A and Malaisse WJ (1978) The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of exogenous pyruvate on islet function. *Biochemical Journal*. 176:217-232
10. Mertz RJ, Worley JF, Spencer B, Johnson JH, Dukes ID. (1996) Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells by specific products of

- glucose metabolism. Evidence for privileged signaling by glycolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 271:4838-45
11. Zawulich WS and Zawulich KC (1997) Influence of pyruvic acid methyl ester on rat pancreatic islets. Effects on insulin secretion, phosphoinositide hydrolysis, and sensitization of the beta cell. *Journal of Biological Chemistry*. 272:3527-3531
  12. Eto K, Tsubamoto Y, Terauchi Y, Sugiyama T, Kishimoto T, Takahashi N, Yamauchi N, Kubota N, Murayama S, Aizawa T, Akanuma Y, Aizawa S, Kasai H, Yazaki Y, Kadowaki T. (1999) Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science*. 283(5404):981-985
  13. Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC y Gilon P. (2003) Hierarchy of the b-cells signals controlling insulin secretion. *European Journal of Clinical Investigation*. 33:742-750
  14. MacDonald MJ, Fallen LA, Brown LJ, Hasan NM, Buss JD y Kendrick MA. (2005) Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial products in insulin secretion. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 288:E1-E15
  15. Litsky ML, Pfeiffer DR. (1997) Regulation of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. *Biochemistry*. 36(23):7071-80
  16. Moreno-Sanchez R. (1985) Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. *Journal of Biological Chemistry*. 260:4028-403
  17. Erecinska M, Bryla J., Michalik M., Meglasson MD. Y Nelson D. (1992) Energy metabolism in islet of Langerhans. *Biochimica et Biophysica Acta* 1101:273-295

18. Maechler P, Wollheim CB. (1999) Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature*. 402(6762):685-689
19. MacDonald MJ y Fallen LA. (2000) Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 275:34025-34027
20. Fernandez-Pascual S, Mukala-Nsengu-Tshibangu A, Martin Del Rio R, Tamarit-Rodriguez J. (2004) Conversion into GABA (gamma-aminobutyric acid) may reduce the capacity of L-glutamine as an insulin secretagogue. *Biochemical Journal*. 379:721-729
21. Corkey BE, Glennon MC, Chen KS, Deeney JT, Matschinsky FM y Pretki M. (1989) A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic b-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 264(36):21608-21612
22. Poitut V. (2003) The ins and outs of fatty acids on the pancreatic b-cell. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 14(5):201-203
23. Haber EP, Procopio J, Carvalho CR, Carpinelli AR, Newsholme P y Curi R. (2006) New insights into fatty acid modulation of pancreatic beta-cell function. *International Review of Cytology*. 248:1-41
24. Mulder H, Lu D, Finley J, An J, Cohen J, Antinozzi PA, McGarry D y Newgard B. (2001). Overexpression of modified human malonyl-CoA decarboxylase blocks the glucose-induced increase in malonyl-CoA level but has no impact on insulin secretion in INS-1-derived (832/13) b-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276(9):6479-6484
25. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic b-cells through GPR40. *Nature* 422:173-176



26. Lu D, Mulder H, Zhao P, Burgess SC, Jensen MV, Kamzolova S, Newgard CB y Sherry D. (2002)  $^{13}\text{C}$  NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99:2708-2713
27. Dean PM, Matthews EK, Sakamoto Y. (1975) Pancreatic islet cells: effects of monosaccharides, glycolytic intermediates and metabolic inhibitors on membrane potential and electrical activity. *The Journal of Physiology*. 246(2):459-478
28. Dean PM y Matthews EK (1970) Electrical activity in pancreatic islet cells: effect of inos. *J Physiol*. 210(2):265-275
29. Cook DL y Hales CN. (1984) Intracellular ATP directly blocks  $\text{K}^+$  channels in pancreatic b-cells. *Nature*. 311(5983):271-273
30. Ashcroft FM, Harrison DE y Ashcroft SJ. (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*. 312(5993):446-448
31. Arkhammar P, Nilsson T, Rorsman P, Berggren PO. (1987) Inhibition of ATP-regulated  $\text{K}^+$  channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 262(12):5448-5454
32. Ashcroft FM, Gribble FM (1999) ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia*. 42:903-919
33. Sakura H, Ámala C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM. (1995) Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel expressed in pancreatic b-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Letters* 377:338-344

34. Göpel S, Kanno T, Brag S, Galvanovskis J, Rorsman P (1999) Voltaje-dependent and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *Journal of Physiology* 521:717-728
35. Niki I, Ashcroft FM, Ashcroft SJ (1989) The dependence on intracellular ATP concentration of ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels and of Na,K-ATPase in intact HIT-T15 beta-cells. *FEBS Letters*. 257(2):361-364
36. Tarasov AI, Giraldo CAJ, Ashcroft FM. (2006). ATP sensitivity of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in intact and permeabilized pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*. 55:2446-2454
37. Ribalet B, John SA, Xie LH, Weiss JN. (2005). Regulation of the ATP-sensitive K channel Kir6.2 by ATP and PIP<sub>2</sub>. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 39:71-77
38. Yang SN, Berggren PO. (2005)  $\beta$ -cell Ca<sub>v</sub> channel regulation in physiology and pathophysiology. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 288:E16-E28
39. Randall A y Tsien RW. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience*. 15:2995-3012
40. Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM. (1968) Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *American Journal of Physiology*. 214:174-178
41. MacDonald PE, Sewing S, Wang J, Joseph JW, Smukler SR, Sakellaropoulos G, Wang J, Saleh MC, Chan CB, Tsushima RG, Salapatek AM, Wheeler MB. (2002) Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 277:44938-44945

42. MacDonald PE, Wheeler MB. (2003) Voltage dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potencial as therapeutic targets. *Diabetologia* 46:1046-1062
43. MacDonald PE, Salapatek AMF, Wheeler MB (2003) Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Physiology*. 546:647-653
44. Rorsman P, Renström E. (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1029-1045
45. Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GW. (2002) Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*. 51(Suppl 1):S83-S90
46. Barg S, Huang P, Eliasson L, Nelson DJ, Obermuller S, Rorsman P, Thevenod F, Renstrom E (2001) Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl<sup>-</sup> uptake and acidification. *Journal of Cell Science*. 114:2145-2154
47. Stiernet P, Guiot Y, Gilon P, Henquin JC. (2006) Glucose acutely decreases pH of secretory granules in mouse pancreatic islets. Mechanisms and influences on insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 281(31):22143-22151
48. Tompkins LS, Nullmeyer KD, Murphy SM, Weber CS, Lynch RM (2002) Regulation of secretory granule pH in insulin-secreting cells. *American Journal of Physiology-Cell Phisiology*. 243:429-437
49. Eto K, Yamashita T, Hirose K, Tsubamoto Y, Ainscow EK, Rutter GA, Kimura S, Noda M, Iino M, Kadowaki T. (2003) Glucose metabolism and glutamate analog acutely alkalinize pH of insulin secretory vesicles of pancreatic beta-cells. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 285:262-271

50. MacDonald PE, Braun M, Galvanovskis J, Rorsman P. (2006) Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic  $\beta$  cells. *Cell Metabolism* 4:283-290
51. Notkins AL (2002) Immunologic and genetic factors in type 1 Diabetes. *Journal of Biological Chemistry*. 277(46):43545-43548
52. von Bohemer H, Sarukhan A. (1999) Immunology: GAD, a single autoantigen for Diabetes. *Science*. 284(5417):1135-1137
53. Esposti MD, Mackay IR (1997) The GABA network and the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 40:352-356
54. Yoon JW, Yoon CS, Lim HW, Huang QQ, Kang Y, Pyun KH, Hirasawa K, Sherwin RS, Jun HS. (1999) Control of autoimmune Diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in  $\beta$ -cells. *Science*. 284(5417):1183-1187
55. Pozzilli P, Leslie RDG (1997) Hyperexpression of GAD in the islet may be relevant but is it sufficient to induce autoimmune insulinitis? *Diabetologia* 40:357-361
56. Spellman CW. (2007) Islet cell dysfunction in progression to Diabetes Mellitus. *Journal of American Osteopathic Association*. 107(suppl 3)5:S1-S5
57. Garry DL, Sorenson RL, Elde RP, Maley BE, Madsen A (1986) Immunohistochemical colocalization of GABA and insulin in  $\beta$ -cells of rat islets. *Diabetes*. 35(10):1090-1095
58. Gerber JC, Hare TA (1979) Gamma-aminobutyric acid in peripheral tissue, with emphasis on the endocrine pancreas. *Diabetes*. 53(12):1038-1045
59. Gylfe E. (1974) Changes of free amino acids in pancreatic  $\beta$ -cells after starvation and substrate deprivation. *Acta Endocrinologica*. 75:105-118

60. Taniguchi H, Okada Y, Seguchi H, Shimada C, Seki M, Tsutou A, Baba S (1979) High concentrations of gamma-aminobutyric acid in pancreatic beta cells. *Diabetes* 28(7):629-633)
61. Okada Y, Taniguchi H, Schimada C. (1976) High concentrations of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 194(4265):650-622
62. Sorenson RL, Garry DG, Brelje TC. (1991) Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. *Diabetes*. 40(11):1365-1374)
63. Maechler P, Gjinovci A, Wollheim CB. (2002) Implications of glutamate in the kinetics of insulin secretion in rat and mouse perfused pancreas. *Diabetes*. 51(Suppl.1):S99-S102)
64. Ergezinger K, Jeschke R, Frauendienst-Egger G, Korall H, Gibson KM, Schuster VH. (2003) Monitoring of 4-hydroxybutyric acid levels in body fluids during vigabatrin treatment in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Annual Neurology* 54(5):685-689)
65. Chambliss KL, Caudle DL, Hinson DD, Moomaw CR, Slaughter CA, Jakobs C, Gibson KM. (1995) Molecular cloning of the mature NAD(+)-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. cDNA isolation, evolutionary homology, and tissue expression. *The Journal of Biological Chemistry* 270(1):461-467)
66. Hearl WG, Churchich JE (1985) A mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent reductase related to the 4-aminobutyrate shunt. *The Journal of Biological Chemistry* 260(30):16361-16366)
67. Garry DJ, Coulter HD, McIntee TJ, Wu JY, Sorenson RL (1987) Immunoreactive GABA transaminase within the pancreatic islet is localized in mitochondria of the B-cell. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 35(8):831-836

68. Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, Sha D, Floor E, Hsu CC, Kopke RD, Wu JY. (2003) Demonstration of functional coupling between  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Science*. 100(7):4293-4298
69. Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folla F, Takei K, De Camilla P. (1991) GABA and pancreatic  $\beta$ -cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *The EMBO Journal* 10(5):1275-1284
70. Chessler SD, Simonson WT, Sweet IR, Hammerle LP. (2002) Expression of the vesicular inhibitory amino acid transporter in pancreatic islet cells. *Diabetes* (51):1763-1771
71. Thomas-Reetz A, Hell JW, During MJ, Walch-Solimena C, Jahn R, De Camilla P. (1993) A  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic  $\beta$  cells. *Proceedings of the National Academy of Science*. 90:5317-5321
72. Hayashi M, Otsuka M, Morimoto R, Muroyama A, Uehara S, Yamamoto A, Moriyama Y. (2003) Vesicular inhibitory amino acid transporter is present in glucagon-containing secretory granules in  $\alpha$ TC6 cells, mouse clonal  $\alpha$ -cells, and  $\alpha$ -cells of islets of Langerhans. *Diabetes* 52:2066-2074
73. Gammelsaeter R, Froyland M, Aragón C, Danbolt NC, Fortin D, Store-Mathisen J, Davanger S, Gundersen V (2004) Glycine, GABA and their transporters in pancreatic islets of Langerhans: evidence for a paracrine transmitter interplay. *Journal of Cell Science* 117:3749-3758
74. Suckow AT, Sweet IR, Van Yserloo B, Rutledge EA, Hall TR, Waldrop M, Chessler SD (2006) Identification and characterization of a novel isoform of the vesicular  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter with glucose-regulated expression in rat islets. *Journal of Molecular Endocrinology* 36:187-199

75. Wang C, Kerckhofs K, van de Casteele M, Smolders I, Pipeleers D, Ling Z. (2006) Glucose inhibits GABA release by pancreatic  $\beta$ -cells through an increase in GABA shunt activity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 290:E494-E499
76. Braun M, Wendt A, Buschard K, Salehi A, Sewing S, Gromada J, Rorsman P. (2004) GABA<sub>B</sub> receptor activation inhibits exocytosis in rat pancreatic beta-cells by G-protein-dependent activation of calcineurin. *Journal of Physiology* 559(Pt2):397-409
77. Winnock F, Ling Z, De Proft R, Dejonghe S, Schuit F, Gorus F, Pipeleers D. (2002) Correlation between GABA release from rat islet  $\beta$ -cells and their metabolic state. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 282:E937-E942
78. Shi Y, Kanaani J, Menard-Rose V, Ma YH, Chang PY, Hanahan D, Tobin A, Grodsky G, Baekkeskov S. (2000) Increased expression of GAD65 and GABA in pancreatic  $\beta$ -cells impairs first phase insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 279:E684-E694
79. Braun M, Wendt A, Birnir B, Broman J, Eliasson L, Galvanovskis J, Gromada J, Mulder H, Rorsman P. (2004) Regulated exocytosis of GABA-containing synaptic-like microvesicles in pancreatic beta-cells. *The journal of General Physiology* 123(3):191-204
80. Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, Rorsman P, Braun M. (2004) Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighbouring beta-cells. *Diabetes* 53(4):1038-1045
81. Gaskins HR, Baldeón ME, Salassie L, Beverly JL. (1995) Glucose modulates  $\gamma$ -aminobutyric acid release from pancreatic  $\beta$ TC6 cell line. *The journal of Biological Chemistry* 270(51):30286-30289

82. Smismans A, Schuit F, Pipeleers D. (1997) Nutrient regulation of gamma-aminobutyric acid release from islet beta cells. *Diabetologia*. 40:1411-1415
83. Braun M, Wendt A, Karanauskaite J, Galvanovskis J, Clark A, MacDonald PE, Rorsman P. (2007) Co-release and differential exit via the fusion pore of GABA, serotonin and ATP from LDCV in rat pancreatic  $\beta$  cells. *The Journal of General Physiology* 129(3):221-231
84. Wang C, Mao R, Van de Casteele M, Pipeleers M, Ling Z (2007) Glucagon-like peptide-1 stimulates GABA formation by pancreatic  $\beta$ -cells at the level of glutamate decarboxylase. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 292:E1201-E1206
85. Gao Z, Young RA, Li G, Najafi H, Buettger C, Sukumvanich SS, Wong RK, Wolf BA, Matschinsky FM. (2003) Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 144(5):1949-1957
86. Li C, Najafi H, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Matschinsky FM, Stanley CA. (2003) Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(5):2853-2858
87. Hutton JC, Sener A, Herchuelz A, Atwater I, Kawazu S, Boschero AC, Somers G, Devis G, Malaisse WJ. (1980) Similarities in the stimulus-secretion coupling mechanisms of glucose- and 2-keto acid-induced insulin release. *Endocrinology*. 106(1):203-219
88. Lenzen S, Formanek H, Panten U. (1982) Signal function of metabolism of neutral amino acids and 2-keto acids for initiation of insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*. 257(12):6631-6633



89. Sener A, Hutton JC, Malaisse WJ. (1981) The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Synergistic effects of L-glutamine and 2-keto acids upon insulin secretion. *Biochemica et Biophysica Acta*. 677(1):32-38
90. Malaisse WJ, Sener A, Malaisse-Legae F, Hutton JC, Christophe J. (1981) The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Metabolic interaction of L-glutamine and 2-ketoisocaproate in pancreatic islets. *Biochemica et Biophysica Acta*. 677:39-49
91. Lenzen S, Schmidt W, Panten U. (1985) Transamination of neutral amino acids and 2-keto acids in pancreatic B-cell mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 260(3):12629-12634
92. Lenzen S, Schmidt W, Rustenbeck I, Panten U. (1986) 2-ketoglutarate generation in pancreatic B-cell mitochondria regulates insulin secretory action of amino acids and 2-keto acids. *Bioscience Reports*. 6(2):163-169
93. Lember N, Idahl LA. (1998)  $\alpha$ -Ketoisocaproate is not a true substrate for ATP production by pancreatic  $\beta$ -cell mitochondria. *Diabetes*. 47:339-344
94. Rabaglia ME, Gray-Keller MP, Frey BL, Shortreed MR, Smith LM, Attie AD. (2005) Alpha-Ketoisocaproate-induced hypersecretion of insulin by islets from diabetes-susceptible mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 289(2):E218-E224
95. Salgado A, Silva AM, Santos RM, Rosário LM. (1996) Multiphasic action of glucose and alpha-ketoisocaproic acid on the cytosolic pH of pancreatic beta-cells. Evidence for an acidification pathway linked to the stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(15):8738-8746
96. Shepherd RM, Gilon P, Henquin JC. (1996) Ketoisocaproic acid and leucine increase cytoplasmic pH in mouse pancreatic B cells: role of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and pH-regulating exchangers. *Endocrinology*. 137(2):677-685

97. Tesis doctoral de Sergio Fernández Pascual. Implicación del sistema GABAérgico en el mecanismo de secreción de insulina. Universidad Complutense de Madrid, Madrid 2003
98. Barrientos A. (2002) In vivo and in organelles assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26:307-316
99. Lee FK, Lee AY, Lin CX, Chung SS, Chung SK. (1995) Cloning, sequencing, and determination of the sites of expression of mouse sorbitol dehydrogenase cDNA. *European Journal of Biochemistry*. 230(3):1059-1065
100. Andriamampandry C, Siffert JC, Schmitt M, Garnier JM, Staub A, Muller C, Gobaille S, Mark J, Maitre M. (1998) Cloning of a rat brain succinic semialdehyde reductase involved in the synthesis of the neuromodulator  $\gamma$ -hydroxybutyrate. *Biochemical Journal*. 334:43-50
101. Shi Q, Chen HL, Xu H, Gibson GE. (2005) Reduction in the E2k subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex has effects independent of complex activity. *Journal of Biological Chemistry*. 280(12):10888-10896
102. Bunik VI, Denton TT, Xu H, Thompson CM, Cooper AJL, Gibson GE (2005) Phosphonate analogues of alpha-ketoglutarate inhibit the activity of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex isolated from brain and in cultured cells. *Biochemistry*. 44(31):10552-10561
103. Sheu KFR, Calingasan NY, Lindsay JG, Gibson GE. (1998) Immunochemical characterization of the deficiency of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in thiamine-deficient rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 70(3):1143-1150
104. Martinez B, del Hoyo P, Martin MA, Arenas J, Perez-Castillo A, Santos A. (2001) Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. *Journal of Neurochemistry*. 78(5):1054-1063

105. Bedet C, Isambert MF, Henry JP, Gasnier B. (2000) Constitutive phosphorylation of the vesicular inhibitory amino acid transporter in rat central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 75:1654-1663
106. Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert M-F, Henry J-P, Triller A, Gasnier B. (1999) Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and Glycinergic synaptic terminal boutons. *Journal of Cell Science*. 112:811-823
107. Hiriart M, Mattenson DR. (1988) Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *Journal of General Physiology*. 91:617-639
108. Yamaguchi M, Matsunaga R, Fukuda K, Nakamura M, Ohkura Y. (1986) Highly sensitive determination of free polyunsaturated fatty acids in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescent detection. *Anal Biochemistry*. 155(2):256-261
109. Yamaguchi M, Matsunaga R, Hara S, Nakamura M, Ohkura Y. (1986) Highly sensitive determination of free fatty acids in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescent detection. *Journal of Chromatography*. 375(1):27-35
110. Iwata T, Inoue K, Nakamura M, Yamaguchi M. (1992) Simple and highly sensitive determination of free fatty acids in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescent detection. *Biomedical Chromatography*. 6(3):120-123
111. Simonides WS, Zaremba R, van Hardeveld C, van der Laarse WJ. (1988) A nonenzymatic method for the determination of picomole amounts of lactate using HPLC: Its application to single muscle fibers. *Analytical Biochemistry*. 169:268-273

112. Tamarit-Rodriguez J, Idahl LA, Giné E, Alcazar O, Sehlin J. (1998) Lactate production in pancreatic islets. *Diabetes*. 47:1219-1223
113. Abushufa R, Reed P, Weinkove C. (1994) Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. *Clinical Chemistry*. 40(9):1707-1712
114. Dünge W, Meyer A, Müller KE, Müller M, Pietschmann R, Plachetta C, Sehr R, Tuss H. (1977) Fluorescent labelling of organic acidic compounds with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-Mmc). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 288(5):361-368
115. Hernández-Fisac I, Fernández-Pascual S, Ortsäter H, Pizarro-Delgado J, Martín del Río R, Bergsten P, Tamarit-Rodriguez J. (2006) Oxo-4-methylpentanoic acid directs the metabolism of GABA into the Krebs cycle in rat pancreatic islets. *Biochemical Journal* 400:81-89
116. Heissig H, Urban KA, Hastedt K, Zünkler BJ, Panten U. (2005) Mechanism of the insulin-releasing action of  $\alpha$ -ketoisocaproate and related  $\alpha$ -keto acid anions. *Molecular Pharmacology*. 68(4):1097-1105
117. Zhu L-J, Altmann SW. (2005) mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Analytical Biochemistry* 345:102-109
118. Brice L, Varadi A, Ashcroft SJH, Molnar E. (2002) Metabotropic glutamate and GABA<sub>B</sub> receptors contribute to the modulation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 45:242-252
119. Mok E, Eléouet-Da Violante C, Daubrosse C, Gottrand F, Rigal O, Fontan JE, Cuisset JM, Guilhot J, Hankard R. (2006) Oral glutamine and amino acid supplementation inhibit whole-body protein degradation in children with Duchenne muscular dystrophy. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83:823-828

120. Loteen AT, Gundersen V. (2007) Glutamine as a precursor for transmitter glutamate, aspartate and GABA in the cerebellum: a role for phosphate-activated glutaminase. *Journal of Neurochemistry*. 104(4):1032-1042
121. Bak LK Schousboe A, Waagepetersen HS. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*. 98(3):641-653
122. Emancipator K. (1999) Laboratory diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Pathology*. 112(5):665-674
123. Abshire VM, Hankins KD, Roehr KE, DiMicco JA. (1988) Injection of L-allilglycine into the posterior hypothalamus in rats causes decreases in local GABA which correlate with increases in heart rate. *Neuropharmacology*. 27(11):1171-1177
124. Brass EP. (1986) Effect of alpha-ketobutyrate on palmitic acid and pyruvate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica acta*. 888(1):18-24
125. Sao TS, Lariosa-Willingham KD, Tu N. (2003) Glutamate-dependent glutamine, aspartate and serine release from rat cortical glial cell cultures. *Brain research* 978(1-2):213-222
126. Michalik M, Nelson J, Erecinska M. (1992) Glutamate production in islets of Langerhans: properties of phosphate-activated glutaminase. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 41(12):1319-1326
127. Lajus S, Vacher P, Huber D, Dubois M, Banassy MN, Ushkaryov YA, Lang J. (2006)  $\alpha$ -Latrotoxin induces exocytosis by inhibition of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by stimulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels via latrophilin in  $\beta$ -cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(9):5522-5531

128. Ashton AC, Ushkaryov YA. (2005) Properties of synaptic vesicles pools in mature central nerve terminals. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(44):37278-37288
129. Yanagisawa I, Yamane M. (1985) Simultaneous separation and sensitive determination of free fatty acids in blood plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 345:229-240
130. Mesmer MZ, Satzger RD. (1998) Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by HPLC/UV-VIS spectrophotometry and HPLC/Thermospray mass spectrometry. *Journal of Forensic Science*. 43(3):489-492
131. Chappell JS, Meyn AW, Ngim KK. (2004) The extraction and infrared identification of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) from aqueous solutions. *Journal of Forensic Science*. 49(1):52-59
132. Blanchet B, Morand K, Hulin A, Astier A. (2002) Capillary gas chromatographic determination of 1,4-butanediol and  $\gamma$ -hydroxybutyrate in human and urine. *Journal of Chromatography B*. 769:221-226
133. de Vriendt CA, van Sassenbroeck DK, Rosseel MT, van de Velde EJ, Verstraete AG, Vander Heyden Y, Belpaire FM. (2001) Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 752:85-90
134. Lyon RC, Johnston SM, Watson DG, McGarvie G, Ellis EM. (2007) Synthesis and catabolism of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(36):25986-25992
135. Pearl PL, Capp PK, Novotny EJ, Gibson KM. (2005) Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults. *Clinical Biochemistry*. 38:1051-1058

136. Gupta M, Hogema BM, Grompe M, Bottiglieri TG, Concas A, Biggio G, Sogliano C, Rigamonti AE, Pearl PL, Snead C, Jakobs C, Gibson KM. (2003) Murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency. American Journal Association. 54(suppl 6):S81-S90
137. Gupta M, Jansen EEW, Senephansiri H, Jakobs C, Snead OC, Gripe M, Gibson KM. (2004) Liver-Directed adenoviral gene transfer in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency. Molecular Therapy. 9(4):527-539
138. Hechler V, Ratomponirina C, Maitre M. (1997)  $\gamma$ -Hydroxybutyrate conversion into GABA induces displacements of GABAB binding that is blocked by valproate and ethosuximide. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 281:753-760
139. Kaupmann K, Cryan JF, Wellendorph P, Mombereau C, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, van der Putten H, Mosbacher J, Bräuner-Osborne H, Waldmeier P, Bettler B. (2003) Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice. European Journal of Neuroscience. 18:2722-2730
140. Mehta AK, Muschaweck NM, Maeda DY, Coop A, Ticku MK. (2001) Binding characteristics of the gamma-hydroxybutyric acid receptor antagonist [(3H)(2E)-(5-hydroxy-5,7,8,9-tetrahydro-6H-benzo[a][7]annulen-6-ylidene)ethanoic acid in the rat brain. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 299(3):1148-1153
141. Bravo DT, Harris DO, Parson SM. (2004) Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB). Journal of Forensic Science. 49(2):379-387
142. Snead OC, Gibson KM. (2005)  $\gamma$ -Hydroxybutyric acid. The New England Journal of Medicine. 352(26): 2721-2732

143. Muller C, Viry S, Miehé M, Andriamampandry C, Aunis D, Maitre M. (2002) Evidence for a gamma-hydroxybutyrate (GHB) uptake by rat brain synaptic vesicles. *Journal of Neurochemistry*. 80(5):899-904
  
144. Li C, Matter A, Kelly A, Petty TJ, Najafi H, MacMullen C, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Kwagh J, Collins HW, Hsu YL, Nissim I, Yudkoff M, Matschinsky FM, Stanley CA. (2006) Effects of a GTP-insensitive mutation of glutamate dehydrogenase on insulin secretion in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(22):15064-15072
  
145. Li C, Allen A, Kwagh J, Dolba NM, Qin W, Najafi H, Collins HW, Matschinsky FZ, Stanley CA, Smith TJ. (2006) Green tea polyphenols modulate insulin secretion by inhibiting glutamate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(15):10214-10221
  
146. Kelly A, Li C, Gao Z, Stanley CA, Matschinsky FM. (2002) Glutaminolysis and insulin secretion. From bedside to bench and back. *Diabetes*. 51(3):S421-S426
  
147. Renstrom E, Ivarsson R, Shears S.B. (2002) Inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate inhibits insulin granule acidification and fusogenic potential. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(30):26717–26720



